



Ana Teresa Coutinho Ribeiro Pereira

Leucemia Mieloide Aguda na Criança: do Diagnóstico ao Prognóstico

Monografia do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Alice Santos Silva e do Dr. Carlos Mendes

Setembro de 2016

*“As our circle of knowledge expands, so does the circumference of darkness
surrounding it.”
- Albert Einstein*

Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio da Professora Dra. Alice Santos, a quem dedico o meu primeiro agradecimento. Não só por aceitar orientar-me, mas também por ter ajudado a desenvolver o meu gosto pela Hematologia Laboratorial.

O meu obrigado vai também para o Dr. Carlos Mendes, pela sua disponibilidade e amabilidade e por ter aceitado coorientar-me.

À Dra. Cristina Silva, pela disponibilidade e pela enorme aprendizagem que me possibilitou, durante a minha passagem pelo Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto.

À Dra. Cecília Correia, por ter permitido a minha breve passagem pelo Serviço de Genética.

A toda a equipa do IPO-Porto, do serviço de Hematologia Laboratorial e dos outros, pelo carinho com que me receberam, pela boa disposição e alegria diária com que trabalham e pelo seu espírito de entreajuda. Estes são só alguns dos valores que levo comigo para o futuro.

A todos os meus colegas do Mestrado em Análises Clínicas, em especial à minha amiga e colega Marta Miranda, pela paciência e ajuda ao longo destes dois anos.

O meu último agradecimento, como não poderia deixar de ser, vai para a minha família e amigos, e para o meu namorado, pela paciência inesgotável, amor incondicional e por acreditarem em mim ao longo de todo o meu percurso académico.

Resumo

O cancro é a principal causa de morte na criança. Nesta faixa etária, as neoplasias mais frequentes são as leucemias agudas, sendo a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) responsável por 15-20% dos casos. Esta é uma doença rara, que apresenta elevada heterogeneidade na sua biologia e na resposta ao tratamento, podendo ser fatal.

As taxas de sobrevivência têm vindo a aumentar nas últimas décadas devido a avanços nos meios de diagnóstico, na terapêutica e nos cuidados de suporte. Os efeitos laterais associados aos tratamentos implementados assumem também particular importância.

O diagnóstico laboratorial baseia-se na combinação de estudos da morfologia das células leucémicas, citoquímica, imunofenotipagem, citogenética e genética molecular. A deteção de alterações cromossómicas e moleculares, bem como a avaliação da Doença Residual Mínima (DRM), apresentam relevante significado prognóstico e permitem a estratificação dos doentes em grupos de risco, permitindo uma adequação da terapêutica.

A abordagem convencional no tratamento da LMA em crianças consiste em quatro a cinco ciclos de quimioterapia, baseada em Antraciclinas e Citarabina, que podem ser combinadas com novos agentes. A Transplantação de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH) é mais indicada em doentes de alto risco em remissão completa e em caso de recidiva. Devido aos problemas de toxicidade, particularmente preocupantes nesta faixa etária, novas formulações e novos agentes, igualmente eficazes, mas menos tóxicos, deverão ser implementados.

No IPO-Porto, entre janeiro de 2014 e junho de 2016, foram diagnosticadas dezasseis crianças com LMA, correspondendo esta neoplasia a uma média anual de 13% dos diagnósticos totais. Avaliou-se a incidência da LMA pediátrica neste período de tempo, sendo apresentados cinco dos casos clínicos estudados.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Aguda Pediátrica; Leucemia Mieloblástica Aguda; Diagnóstico; Prognóstico.

Abstract

Cancer is the leading cause of death in children. In this age group, the most frequent malignancies are acute leukemias, of which Acute Myeloid Leukemia (AML) is responsible for 15%-20% of the cases. It is a rare disease, presenting a highly heterogeneous biology, outcome and response to treatment.

Survival rates have improved in recent decades due to advances in treatment and supportive care. The side effects associated with treatments implemented are of particular importance.

The laboratorial diagnosis is based on the combination of different studies, including the morphology of leukemic cells, cytochemistry, immunophenotyping, cytogenetics and molecular genetics. The detection of certain chromosomal and molecular alterations, as well as the evaluation of minimal residual disease, have important prognostic significance and allow the stratification of patients into risk groups, allowing the most adequate therapy.

The conventional approach in the treatment of AML in children consists of four to five courses of chemotherapy based on anthracycline and citarabine, which can be combined with new agents. Hematopoietic stem cell transplantation is indicated to patients of high risk, in complete remission, and in case of relapse. Due to problems of toxicity, of particular concern in this age group, new formulations and new agents, equally effective but less toxic, should be implemented.

In IPO-Porto, between January 2014 and June 2016, sixteen children were diagnosed with AML, corresponding to an annual average of 13% of total malignancies. The incidence of pediatric AML was evaluated for this period of time, and five of the studied clinical cases are presented.

Keywords: Pediatric Acute Myeloid Leukemia; Acute Myelogenous Leukemia; Diagnosis; Prognosis;

Conteúdo

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas	ix
Abreviaturas	x
1 Introdução.....	1
1.1 Epidemiologia e Etiologia	1
1.1.1 Incidência	1
1.1.2 Fatores de risco.....	2
1.2 Patogênese	3
2 Classificação.....	5
2.1 Classificação FAB	5
2.2 Classificação da OMS	8
3 Diagnóstico laboratorial.....	10
3.1 Morfologia.....	10
3.1.1 Diferenciação entre LMA e Síndrome Mielodisplásica (SMD)	13
3.2 Imunofenotipagem	13
3.3 Citogenética	16
3.4 Genética Molecular.....	17
4 Prognóstico.....	18
4.1 Estratificação do risco com base em alterações citogenéticas e moleculares....	18
4.2 Doença Residual Mínima (DRM)	19
4.3 Outros fatores com significado prognóstico	19
5 Tratamento	21
5.1 Transplantação de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH)	22
5.2 Terapêutica de suporte.....	23
5.3 Tratamento e Profilaxia do envolvimento do SNC.....	23

5.4	Tratamento de recidivas	24
6	Subgrupos específicos de LMA.....	25
6.1	LMA em crianças com menos de 2 anos	25
6.2	LMA associada à Síndrome de Down	26
6.3	Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)	27
7	Crianças diagnosticadas com LMA no IPO-Porto entre janeiro de 2014 e junho de 2016.....	29
7.1	Incidência	29
7.2	Casos clínicos	31
	Caso 1.....	32
	Caso 2.....	35
	Caso 3.....	37
	Caso 4.....	39
	Caso 5.....	41
8	Conclusão	43
	Referências bibliográficas	44

Lista de Figuras

Figura 1 - Células blásticas indiferenciadas de uma criança com LMA minimamente diferenciada (LMA-M0)	6
Figura 2 - Promielócitos de uma criança com LPA (LMA-M3)	6
Figura 3 - Esfregaço de sangue periférico de uma criança com LPA variante (LMA-M3v). 7	
Figura 4 - Células blásticas indiferenciadas de uma criança com leucemia aguda de características mielomonocíticas (LMA-M4 ou LMA-M5).....	7
Figura 5 - Hemograma sem alterações.	11
Figura 6 - Hemograma de uma criança com LMA.	11
Figura 7 - Achados característicos de esfregaços sanguíneos de doentes com LMA.	12
Figura 8 - Estratégias de gating FSC/SSC e CD45/SSC..	15
Figura 9 - Cariótipos com translocações frequentes na LMA pediátrica.	16
Figura 10 - Cariótipos com translocações frequentes na LMA pediátrica	17
Figura 11 - Crianças diagnosticadas com LMA e outras neoplasias no IPO-Porto.	29
Figura 12 - Crianças diagnosticadas com LMA e LLA no IPO-Porto.....	29
Figura 13 - Crianças com menos de dois anos diagnosticadas com LMA ou outras neoplasias no IPO-Porto.	30
Figura 14 - Hemograma do doente - caso 1	32
Figura 15 - Morfologia das células blásticas observadas no esfregaço sanguíneo do doente – caso 1.	33
Figura 16 - Morfologia das células monocitóides observadas no esfregaço sanguíneo do doente – caso 1.....	33
Figura 17 - O Hemograma do doente – caso 2.....	35
Figura 18 - Morfologia das células blásticas presentes no esfregaço sanguíneo do doente – caso 2.	36
Figura 19 - Hemograma do doente – caso 3.	37
Figura 20 - Morfologia das células blásticas presentes no esfregaço sanguíneo do doente – Caso 3.....	38
Figura 21 - Hemograma do doente – caso 4.	39
Figura 22 - Morfologia das células blásticas presentes no esfregaço sanguíneo do doente – caso 4.	40
Figura 23 - Hemograma do doente – caso 5.	41
Figura 24 - Morfologia dos promielócitos presentes no esfregaço sanguíneo do doente – caso 5.	42

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Fatores de risco associados com LMA pediátrica.....	2
Tabela 2 - Classificação Morfológica FAB para as LMA.	5
Tabela 3 - Classificação da OMS, de 2008, para as LMA e neoplasias relacionadas e alterações sugeridas na revisão de 2016.	9
Tabela 4 - Procedimentos e testes recomendados para o estudo de crianças com LMA.	10
Tabela 5 - Painel de marcadores recomendado no diagnóstico de crianças com LMA. ..	15
Tabela 6 - Estratificação do risco com base nas alterações citogenéticas, moleculares e na avaliação da DRM.	20
Tabela 7 - Perfil imunofenotípico das células blásticas encontrados nas crianças com SMT e LM-SD.....	26
Tabela 8 - Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 1.....	33
Tabela 9 - Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 1.	34
Tabela 10 - Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 2.....	36
Tabela 11 - Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 2.....	36
Tabela 12 - Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 3.....	38
Tabela 13 - Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 3.....	38
Tabela 14 - Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 4.....	40
Tabela 15 - Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 4.....	40
Tabela 16 - Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 5.....	42
Tabela 17 - Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 5.....	42

Abreviaturas

BFM – *Berlin-Frankfurt-München*

CD – *Cluster of Differentiation*

CEBPA – *CCAAT/Enhancer-Binding Protein-α*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

DRM – Doença Residual Mínima

EGIL – *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*

FAB – *French-American-British*

FISH – *Fluorescence In Situ Hybridization*

FLT3 – *Fms-related Tyrosine Kinase 3*

FSC – *Foward Scatter*

GO – Gentuzumab Ozogamicina

HLA-DR – *Human Leucocyte Antigen D Related*

i – Inversão

iMPO – Mieloperoxidase intracelular

IPO – Instituto Português de Oncologia

ITD – *Internal Tandem Duplication*

KIT – *KIT Proto-oncogene Receptor Tyrosine Kinase*

KMT2A – *Lysine Methyltransferase 2A*

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LMA-CBF – Leucemia Mieloide Aguda associada ao *Core-Binding Factor*

LMA-CN – Leucemia Mieloide Aguda de Cariótipo Normal

LM-SD – Leucemia Mieloide associada a Síndrome de Down

LPA – Leucemia Promielocítica Aguda

MIC – Classificação Morfológica, Imunológica e Citogenética

MPAL – *Mixed Phenotype Acute Leukemia*

MPO – Mieloperoxidase

NG2 – *Neural Glial Antigen 2*

NPM1 – *Nucleophosmin*

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – Braço curto de um cromossoma

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

q – Braço longo de um cromossoma

RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SLT – Síndrome de Lise de Tumor

SMD – Síndrome Mielodisplásica

SMT – Síndrome Mieloproliferativa Transitória

SNC – Sistema Nervoso Central

SSC – *Side Scatter*

t – Translocação

TCPH – Transplantação de Células Progenitoras Hematopoiéticas

TdT – *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*

WT1 – *Wilms Tumor 1*

1 Introdução

O cancro é considerado a principal causa de morte pediátrica. A leucemia é uma das neoplasias mais frequentes na criança e pode ser classificada, atendendo à linhagem celular envolvida, em linfóide ou mieloide, e, atendendo ao grau de maturação das células leucémicas, em crónica ou aguda.

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA), também conhecida como leucemia mieloblástica aguda ou leucemia não-linfoblástica aguda, é uma neoplasia do foro hematológico de carácter heterogéneo. Caracteriza-se por um bloqueio na maturação da linhagem mieloide durante a hematopoiese, associado à proliferação clonal das células imaturas e à diminuição das células maduras. Na criança, a LMA apresenta-se quase exclusivamente como uma doença *de novo*.

A apresentação clínica desta doença resulta da proliferação descontrolada de células leucémicas e consequente comprometimento das restantes linhagens celulares. Os sinais e sintomas clínicos variam consoante o grau de evolução da doença, avaliado particularmente pela extensão do infiltrado leucémico na medula óssea e outros órgãos. As principais manifestações clínicas desta doença são a hepatoesplenomegalia, anemia, hemorragias, febre e palidez (1).

1.1 Epidemiologia e Etiologia

1.1.1 Incidência

A leucemia, os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) e os linfomas são as neoplasias mais frequentes na criança. A leucemia, em particular, é responsável por cerca de 30% dos diagnósticos em crianças com menos de quinze anos, nos países desenvolvidos (2).

Na Europa, são diagnosticados 46,7 casos/milhão/ano, com incidências que variam conforme o país. Em Portugal, de acordo com os dados do Registo Oncológico Nacional de 2005, as leucemias representam 31% das neoplasias pediátricas (2).

A LMA, em particular, é responsável por quase 20% dos casos pediátricos na Europa e, de acordo com dados recolhidos pelo grupo de estudo de doentes oncológicos EURO CARE entre 2005 e 2007, a sua taxa de sobrevivência foi de, aproximadamente, 64% (3).

1.1.2 Fatores de risco

O conhecimento dos fatores de risco envolvidos na LMA pediátrica é de extrema importância para a melhor compreensão da etiologia desta doença. Apesar de serem vários os fatores de risco apontados como potencialmente associados ao desenvolvimento da LMA nos adultos, dada a raridade desta doença na criança, os estudos existentes são escassos, condicionando as conclusões.

As causas conhecidas da LMA pediátrica, como a exposição *in utero* a radiação ionizante, a Síndrome de *Down*, e outras alterações genéticas como a Neurofibromatose, a Anemia de *Fanconi* e a Síndrome de *Bloom*, representam apenas uma pequena parte dos casos, totalizando menos de 10% (4–8). Outros fatores de risco, genéticos ou ambientais, são também indicados como potenciais causas (Tabela 1).

Tabela 1 – Fatores de risco associados com LMA pediátrica.

Fatores genéticos	Fatores ambientais
Síndrome de <i>Down</i>	Radiação ionizante
Anemia de <i>Fanconi</i>	Campos eletromagnéticos
Neurofibromatose tipo 1	Agentes citotóxicos
Síndrome de <i>Bloom</i>	Consumo parental de álcool ou tabaco
	Medicação
	Pesticidas ou herbicidas
	Riscos perinatais ou reprodutivos
	Infeções/resposta à infecção

O aumento da idade materna parece predispor as crianças para neoplasias, incluindo a LMA. No que diz respeito à idade paterna, as evidências são inconclusivas, mas este fator parece ser neutralizado quando ajustado para a idade materna (9).

Vários estudos têm evidenciado que há um risco mais elevado de desenvolvimento de LMA em crianças com pais consumidores de álcool, embora seja desconhecida a quantidade de álcool responsável pela alteração (10). Relativamente ao hábitos tabágicos parentais, um estudo mais recente evidenciou um maior risco de LMA em crianças em que o pai era fumador, mas o mesmo não se verificou para mães fumadoras (11). A associação com exposição ao benzeno, embora estabelecida nos adultos, revela-se bastante inconclusiva nas crianças (12).

O peso da criança ao nascimento pode ser outro fator de risco, tanto para percentis mais altos como para percentis mais baixos que o normal (13).

O tratamento de outras neoplasias recorrendo a inibidores da topoisomerase II está frequentemente associado ao desenvolvimento de LMA. Estes inibidores ocorrem naturalmente em alguns alimentos, principalmente nos que contêm flavonoides, como o chá, vinho tinto, algumas frutas e vegetais, entre outros. Dietas ricas nesses alimentos, durante a gravidez, têm vindo a ser indicadas como fator de risco para o desenvolvimento de LMA, nomeadamente LMA com rearranjos do gene *Lysine Methyltransferase 2A*, (*KMT2A*, anteriormente designado de *MLL*), mais frequente em crianças com menos de dois anos (14).

1.2 Patogénese

Os estudos do cariótipo e de genética molecular em amostras de doentes com LMA têm permitido compreender melhor os mecanismos que estão envolvidos na sua patogénese. Determinadas translocações cromossómicas e mutações génicas permitem a classificação da LMA em subgrupos.

A patogénese da LMA está associada ao aparecimento de proteínas de fusão com atividade anormal, resultantes de translocações cromossómicas específicas. Estas envolvem, na maioria das vezes, genes que codificam fatores de transcrição hematopoiéticos. Deste modo, as proteínas de fusão resultantes apresentam atividade transcripcional anormal, levando a um bloqueio da maturação das células hematopoiéticas (15).

Das várias alterações cromossómicas descritas na LMA (Tabela 3), as mais frequentes na criança são a translocação $t(8;21)(q22;q22)$, *RUNX1-RUNX1T1*; (Figura 9A) e a inversão $inv(16)(p13.1q22)$, *CBFB-MYH11*; (Figura 9B) conjuntamente designadas de LMA associada ao *core binding factor* (LMA-CBF); bem como a $t(15;17)(q22;q21)$, *PML-RARA*; (Figura 10A), responsável pela Leucemia Promielocítica Aguda (LPA). Os rearranjos do cromossoma 11q23, quase exclusivamente envolvendo o gene *KMT2A*, são também um achado bastante frequente, particularmente no subgrupo de crianças com menos de dois anos, sendo a translocação $t(9;11)(p22;q23)$ a mais frequente (Figura 10B). Cerca de 20% dos casos de LMA pediátrica apresenta citogenética normal (subgrupo designado de LMA-CN) (16,17).

Outras alterações, embora menos frequentes, podem também ser encontradas em crianças com LMA, nomeadamente, monossomias 7, alterações do braço longo do cromossoma 7 (7q), ou do braço curto do 12 (12p), ou do braço longo do 5 (5q), bem como as trissomias 4, 6, 13, 19 e 21 (16,17).

Adicionalmente, a LMA pode estar associada a mutações génicas específicas (Tabela 3). Os genes mais frequentemente envolvidos são o *Fms-related Tyrosine Kinase*

3 (*FLT3*) e o *Nucleophosmin* (*NPM1*). Outras mutações envolvendo os genes *CCAAT/Enhancer-Binding Protein-α* (*CEBPA*), *KIT Proto-oncogene Receptor Tyrosine Kinase* (*KIT*), *KMT2A*, *Wilms Tumor 1* (*WT1*), *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog* (*NRAS*) e *KRAS Proto-oncogene, GTPase* (*KRAS*) são também encontradas em crianças com LMA.

O *FLT3* codifica um recetor tirosina cinase envolvido na proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas. Mutações neste gene podem ocorrer em qualquer tipo de LMA, sendo mais comuns na LMA com t(6;9)(p23;q34), na LPA e na LMA-CN. Podem ocorrer dois tipos de mutações neste gene, nomeadamente *Internal Tandem Duplication* (*FLT3-ITD*) e *second Tyrosine Kinase Domain* (*FLT3-TKD*), sendo a primeira mais frequente (18).

O *NPM1* codifica uma fosfoproteína com função de *chaperone*, envolvida em diversos processos celulares. Mutações neste gene encontram-se associadas a diversas neoplasias, sendo muito prevalentes na LMA, nomeadamente na LMA-CN (19).

O *CEBPA* codifica o fator de transcrição C/EBPα, envolvido na regulação da diferenciação celular. Este gene é expresso nos precursores mieloides durante a hematopoiese, regulando a expressão de vários genes específicos dos granulócitos. Mutações neste gene, geralmente bialélicas, são exclusivas da LMA e resultam na respetiva perda de função. Esta alteração é mais frequente nas LMA-CN e, numa pequena parte dos casos, podem coexistir as mutações no *NPM1* e no *CEBPA* (20).

O *WT1* codifica um fator de transcrição expresso nas células progenitoras hematopoiéticas. Mutações neste gene resultam na formação de uma proteína incapaz de se ligar ao DNA, estando associadas a alguns casos de LMA pediátrica. Por outro lado, este gene surge também em sobre-expressão em alguns tipos de leucemias agudas. Este tipo de mutações é muitas vezes encontrado em associação com mutações *FLT3-ITD* (21,22).

O *KIT*, membro da família tirosina cinase tipo III, está envolvido na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células progenitoras hematopoiéticas, através da ativação de vias de sinalização. Mutações envolvendo o *KIT* são encontradas predominantemente em associação com as LMA-CBF (23).

A família de genes *RAS*, constituída pelo *HRAS*, *KRAS* e pelo *NRAS*, codifica proteínas de ligação ao *Guanosine Nucleotide Phosphate* (GTP), com função nas vias de sinalização intracelulares. Mutações nos genes *RAS* são encontradas na LMA, nomeadamente na LMA com rearranjos do *KMT2A*, na LMA com inv(16) e na LMA com mutação no *NPM1*. Estas mutações resultam na ativação de vias de hiper-proliferação celular. Dentro desta família de genes, as mutações envolvendo o *NRAS* e o *KRAS* são as mais frequentes nas crianças (24).

2 Classificação

A classificação da LMA baseava-se inicialmente nos achados morfológicos e citotóxicos das células blásticas da medula óssea e do sangue periférico, de acordo com a Classificação *French-American-British* (FAB) (25). Mais tarde, passaram a avaliar-se também as alterações citogenéticas e a fazerem-se estudos de imunofenotipagem, tendo sido criada a Classificação Morfológica, Imunológica e Citogenética (MIC) (26). A evolução científica e tecnológica evidenciou ainda a importância do estudo das alterações moleculares, que passaram a incluir-se. Atualmente, no diagnóstico laboratorial usa-se a Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), publicada em 2008, e a Classificação FAB, com especial importância nos estudos morfológicos (18,25).

2.1 Classificação FAB

A Classificação FAB, inicialmente publicada em 1976, foi posteriormente expandida, modificada e clarificada. Segundo esta classificação, a LMA é categorizada em 8 subtipos (M0 a M7), atendendo às suas características morfológicas e percentagem e grau de maturação dos mieloblastos (25,27). A Tabela 2 procura resumir os oito subtipos da LMA, segundo esta classificação.

Tabela 2 – Classificação Morfológica FAB para as LMA.

Subtipo		Caraterísticas
M0	LMA minimamente diferenciada	Grandes, agranulares, indiferenciados (Figura 1)
M1	LMA sem maturação	Agranulares e granulares; > 90% de células não eritroides; 50% das células com <i>Corpos de Auer</i>
M2	LMA com maturação	~ 30% com maturação ≥ promielócito Componente monocítico < 20%
M3	Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)	Predomínio de células com maturação ≥ promielócito, com granulação forte; Aglomerados de <i>Corpos de Auer</i> (Figura 2)
	M3v: Leucemia Promielocítica Aguda, Variante	Predomínio de promielócitos com características hipogranulares e com núcleo bilobado (Figura 3)
M4	Leucemia Mielomonocítica Aguda	> 20% de células monocíticas entre as células nucleadas (Figura 4)
M5	M5a: Leucemia Monoblástica Aguda	Indiferenciada, com predomínio de mieloblastos na medula óssea (Figura 4)
	M5b: Leucemia Monocítica Aguda	Diferenciada, com predomínio de monócitos no sangue periférico e de promonócitos na medula óssea
M6	Eritroleucemia	Eritroblastos ≥ 50% das células nucleadas da medula óssea Células blásticas ≥ 30% das células eritroides
M7	Leucemia Megacarioblástica Aguda	Megacarioblastos ≥ 30% das células nucleadas da medula óssea

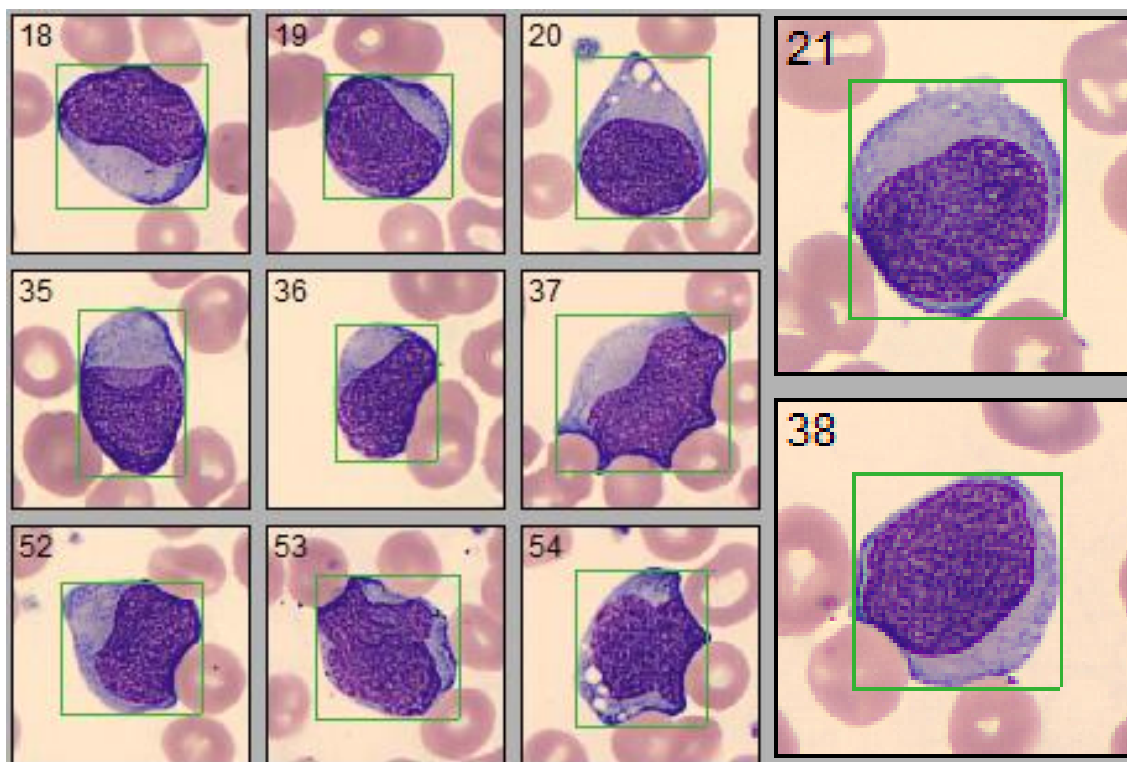


Figura 1 – Células blásticas indiferenciadas de tamanho médio/grande, agranulares, com citoplasma moderadamente basófilo, esboçando por vezes nucléolos, encontradas num esfregaço de sangue periférico de uma criança com LMA minimamente diferenciada, correspondente à LMA-M0 pela Classificação FAB (imagens obtidas pelo Microscópio Digital *CellaVision*® DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após Coloração de May-Grünwald-Giemsa).

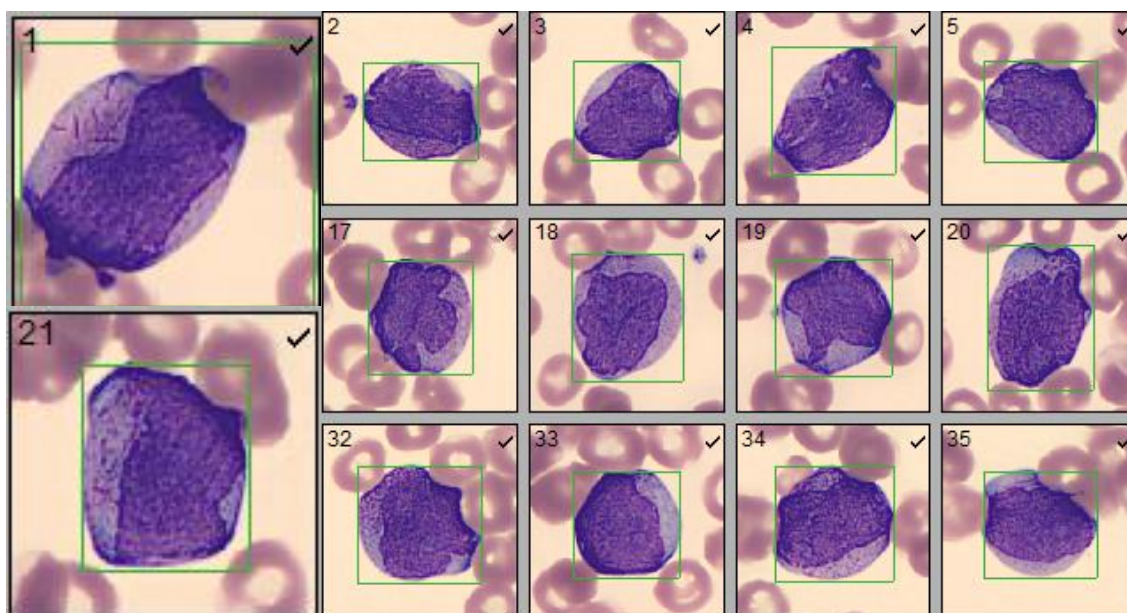


Figura 2 - Promielócitos com intensa granulação azurófila, grande pleomorfismo, esboçando por vezes Corpos de Auer e nucléolos, encontrados num esfregaço de sangue periférico de uma criança com LPA, correspondente à LMA-M3, pela Classificação FAB (imagens obtidas pelo Microscópio Digital *CellaVision*® DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após Coloração de May-Grünwald-Giemsa).

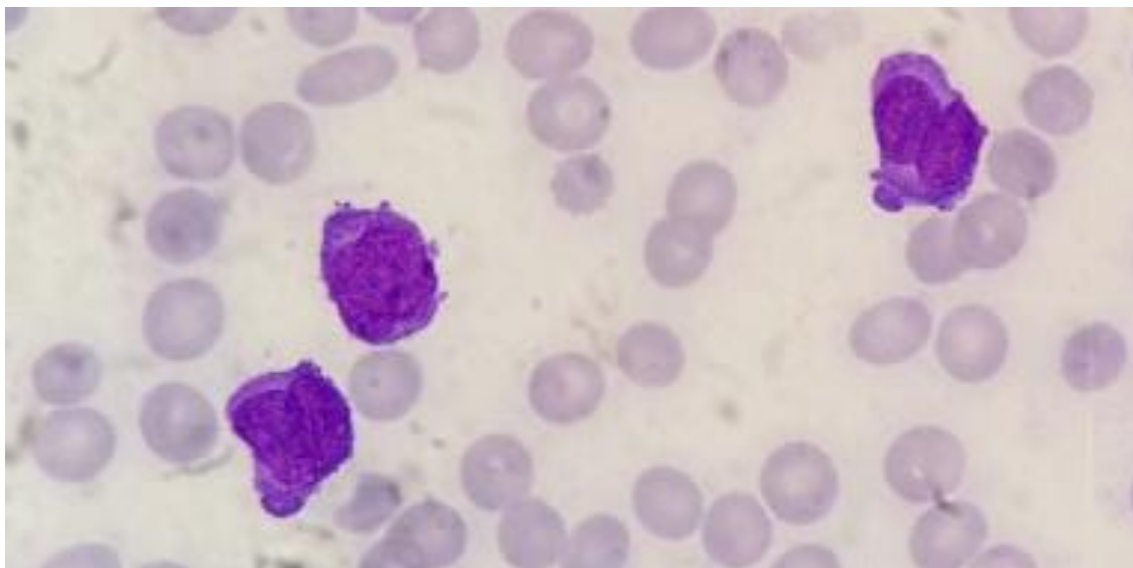


Figura 3 – Esfregaço de sangue periférico de uma criança com LPA variante, correspondente à LMA-M3v pela Classificação FAB, com promielócitos bilobados, observados sob ampliação de 1000x (fotografias obtidas no Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto).

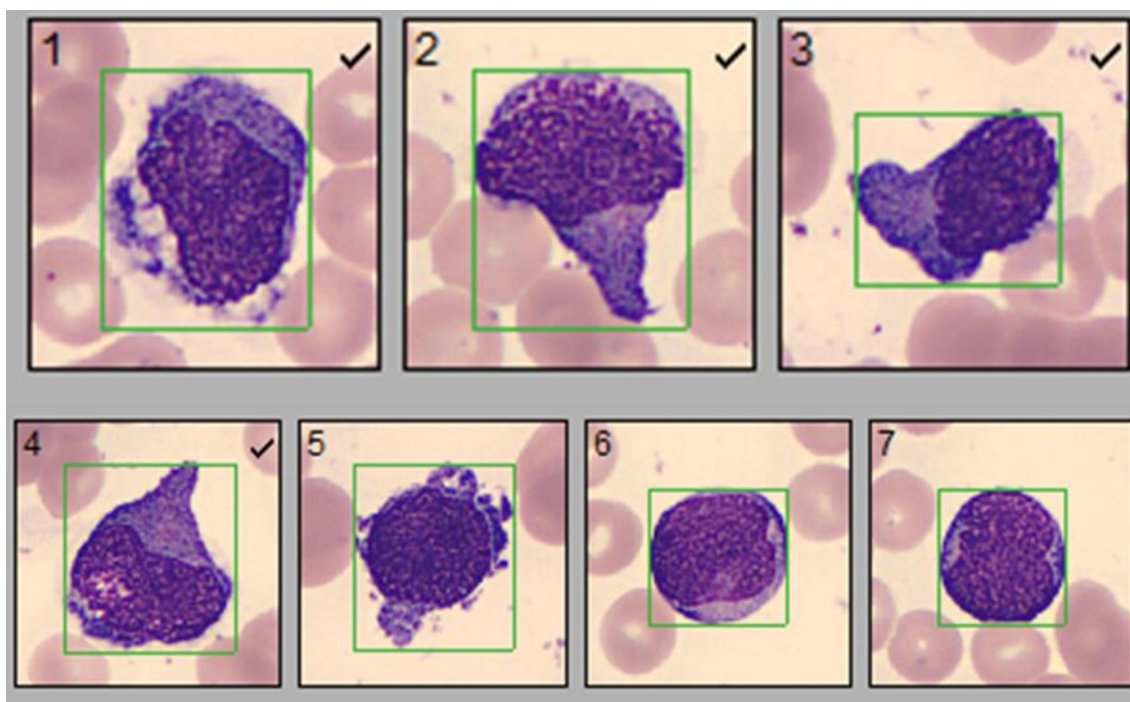


Figura 4 – Células blásticas indiferenciadas, muito pleomórficas, com basofilia intensa, projeções citoplasmáticas, granulação azurófila variável, esboçando por vezes nucléolos, encontradas num esfregaço de sangue periférico de uma criança com leucemia aguda de características mielomonocíticas, correspondente à LMA-M4 ou LMA-M5 da Classificação FAB. (imagens obtidas pelo Microscópio Digital *CellaVision*® DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto).

2.2 Classificação da OMS

A Classificação da OMS engloba, para além da informação proveniente dos estudos morfológicos e citotóxicos e da história clínica do doente, a informação proveniente da imunofenotipagem e dos estudos citogenéticos e moleculares. Esta classificação divide a LMA em diferentes categorias, atendendo, essencialmente, aos achados citogenéticos e moleculares mais relevantes (18).

A Classificação de Tumores do Sistema Hematopoiético e de Tecidos Linfoides da OMS foi pela última vez atualizada em 2008. Desde então, com os avanços na análise da expressão génica e nas técnicas de sequenciação, foram identificados novos biomarcadores de extrema importância no diagnóstico e prognóstico das entidades atualmente incluídas nesta classificação, e que realçam a importância da inclusão de outras entidades clínicas no futuro. Em 2016 foi publicada uma revisão desta classificação, que sugere várias alterações a esta classificação (28).

A Classificação da OMS de 2008, bem como as alterações sugeridas pela revisão de 2016, são apresentadas na Tabela 3. Algumas das modificações propostas incidem sobre alterações genéticas importantes na LMA pediátrica.

O gene de fusão *PML-RARA* pode resultar de uma translocação críptica ou de outros rearranjos citogenéticos complexos que não a $t(15;17)(q24.1;q21.2)$, pelo que é sugerido que a LPA com este gene de fusão seja designada por “LPA com *PML-RARA*”. Esta revisão inclui ainda a alteração do nome do gene *MLL* para *KMT2A* (28).

A LMA com mutação no gene *CEBPA*, anteriormente indicada com carácter provisório, é sugerida como uma entidade clínica, com carácter definitivo. A definição de um prognóstico favorável passa a implicar a presença de uma mutação bialélica (29).

Nesta revisão a presença de mutações no gene *NPM1* ou no *CEBPA* (bialélicas) assume maior relevância, relativamente à presença de displasia multilineagem, que, na ausência de alterações citogenéticas associadas a Síndrome Mielodisplásica (SMD), não apresenta valor prognóstico (30,31).

Tabela 3 – Classificação da OMS, de 2008, para as LMA e neoplasias relacionadas (18) e alterações sugeridas na revisão de 2016 (28).

Categorias	Classificação da OMS de 2008	Alterações sugeridas em 2016
LMA com anomalias genéticas recorrentes	LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	
	LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	
	LPA com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>	LPA com <i>PML-RARA</i>
	LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>	LMA com alterações no 11q23 (<i>KMT2A</i>)
	LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>	
	LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>	LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
	LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>	LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
	Entidade provisória: LMA com mutação no <i>NPM1</i>	LMA com mutação no <i>NPM1</i>
	Entidade provisória: LMA com mutação no <i>CEBPA</i>	LMA com mutação bialélica no <i>CEBPA</i>
		Entidade provisória: LMA com <i>BCR-ABL1</i>
		Entidade provisória: LMA com mutação no <i>RUNX1</i>
LMA com alterações displásicas		
Neoplasias mieloides associadas à terapêutica		
LMA sem especificações	LMA com diferenciação mínima	
	LMA sem maturação	
	LMA com maturação	
	Leucemia mielomonocítica aguda	
	Leucemia monoblástica/monocítica aguda	
	Leucemia eritroide aguda Leucemia eritroide pura Eritroleucemia, eritroide/mieloide	Leucemia eritroide pura
	Leucemia megacarioblástica aguda	
	Leucemia basofílica aguda	
	Panmielose aguda com mielofibrose	
Sarcoma mieloide		
Proliferações mieloides associadas à Síndrome de Down	Síndrome Mieloproliferativa Transitória (SMT)	
	Leucemia mieloide associada a Síndrome de Down (LM-SD)	
Neoplasia das células dendríticas plasmocitóides blásticas		

3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da LMA, seja na criança ou no adulto, engloba estudos de morfologia, citoquímica, imunofenotipagem, citogenética convencional (cariótipo) e molecular (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) e de genética molecular nas células hematopoiéticas da medula óssea (32,33).

O grupo internacional *Berlin-Frankfurt-Münster* (BFM) de estudo da LMA, criou, em 2012, um conjunto de recomendações específicas para a abordagem inicial e diagnóstico de LMA na criança (32).

Ao contrário do que acontece nos adultos, na LMA pediátrica é frequente haver envolvimento do SNC, cujo tratamento é distinto. Os mecanismos responsáveis pelo seu envolvimento na LMA não são bem conhecidos; no entanto, existem várias formas pelas quais as células leucémicas podem alcançar este compartimento (34). A abordagem inicial deve incluir a realização de uma punção lombar e posterior pesquisa de células leucémicas no Líquido Cefalorraquidiano (LCR). Há envolvimento do SNC quando se obtém uma contagem de leucócitos superior a $5 \times 10^6/L$ numa amostra de LCR não hemorrágica, com presença de células blásticas (32).

Na Tabela 4 estão sumariados os procedimentos e testes recomendados na abordagem de crianças com LMA.

Tabela 4 – Procedimentos e testes recomendados para estudo de crianças com LMA.

Hemograma
Estudos de Imunofenotipagem, Citogenética e Genética Molecular em sangue periférico
Aspirado de medula óssea para Mielograma, Imunofenotipagem, Estudos citogenéticos e moleculares
Biópsia de Medula Óssea
Punção Lombar

3.1 Morfologia

A primeira etapa do diagnóstico passa pela realização de um hemograma e de uma cuidadosa análise morfológica das células do sangue periférico. A Figura 5 representa um hemograma sem alterações. Os achados mais frequentes do hemograma na LMA são a anemia, trombocitopenia e hiperleucocitose (Figura 6 e 7). Confirmadas estas alterações no sangue periférico, deve realizar-se um aspirado medular, para posterior realização de mielograma e esfregaço de medula óssea.

Os esfregaços de sangue e de medula óssea devem ser corados utilizando um Corante *Romanovsky*, como, por exemplo, o *May-Grünwald-Giemsa* ou o *Wright-Giemsa*.

Deverão ser contadas e identificadas 200 células no esfregaço de sangue periférico e 500 células no esfregaço de medula óssea, em regiões contendo pequenos fragmentos de osso (33).

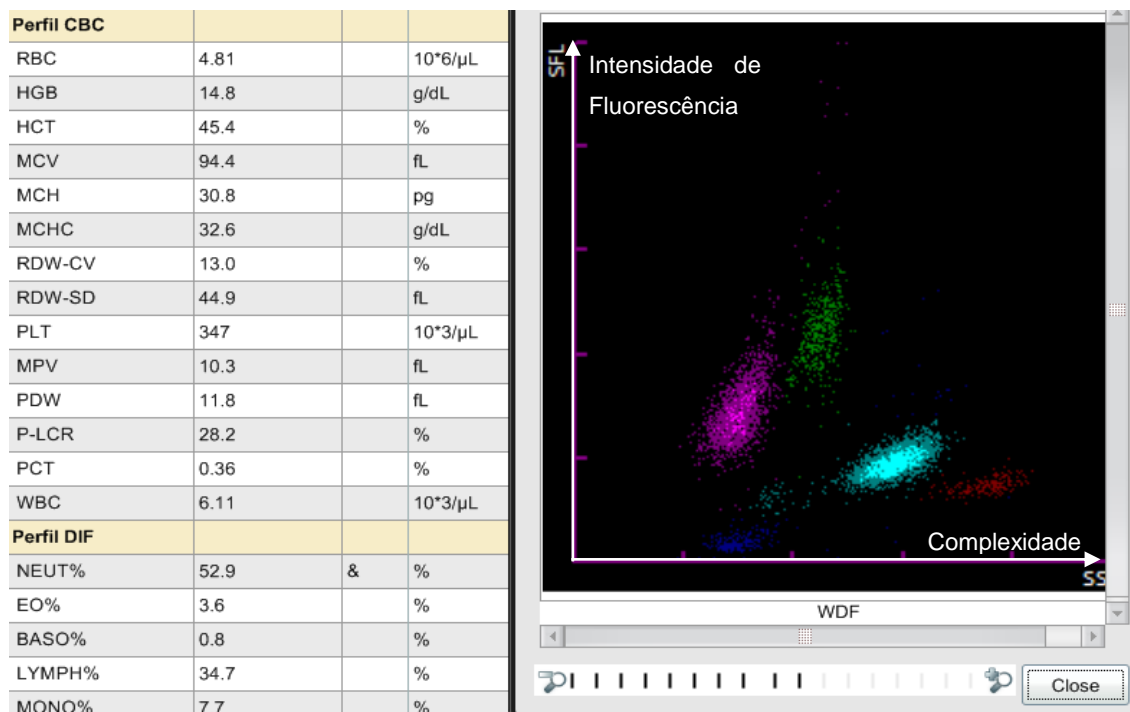


Figura 5 - Hemograma sem alterações; gráfico de dispersão que evidencia quatro populações celulares: linfócitos (magenta), monócitos (verde), neutrófilos e basófilos (azul claro) e eosinófilos (vermelho) (informação fornecida pelo Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto).

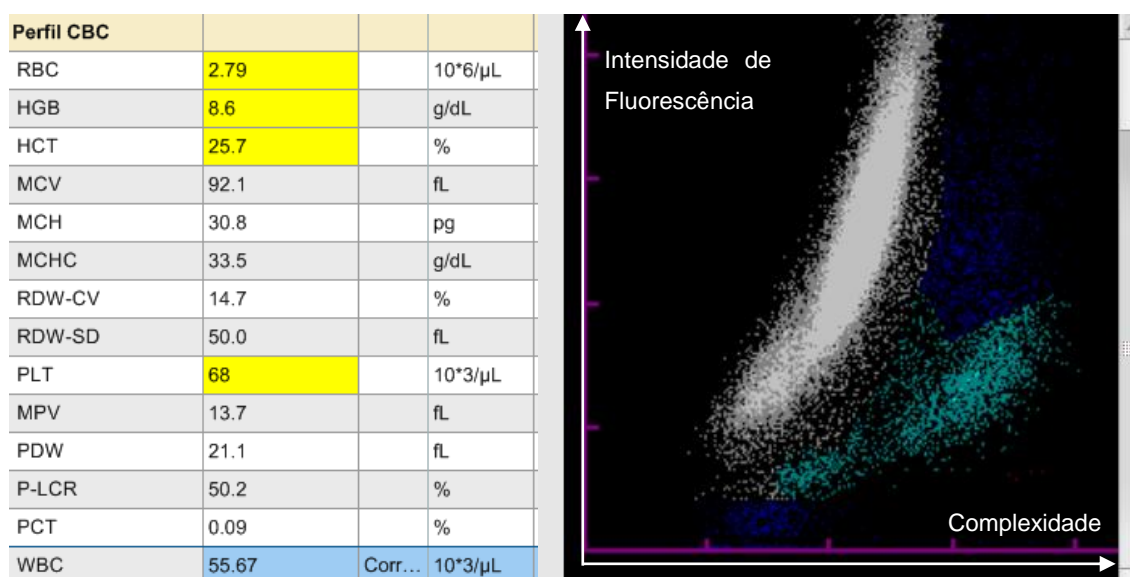


Figura 6 - Hemograma de uma criança com LMA; os resultados do Hemograma evidenciam anemia, trombocitopenia e hiperleucocitose; o gráfico de dispersão evidencia uma grande população de intensa fluorescência, sugestiva da presença de células blásticas (a cinzento) (informação fornecida pelo Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto).

Em termos morfológicos, deve considerar-se uma LMA quando o sangue periférico ou a medula óssea revelam uma contagem igual ou superior a 20% de células blásticas, com diferenciação (variável) mieloide (Tabela 2). Em crianças com Síndrome de *Down*, a LMA pode ser diagnosticada, mesmo que a contagem medular de células blásticas seja inferior a 20%. A mesma exceção deve ser adotada quando são detetadas determinadas alterações genéticas, específicas de um subtipo de LMA, como é o caso da t(15;17), da t(8;21), da inv(16) (18).

Sarcomas Mieloides são um achado bastante frequente na apresentação clínica da LMA, sobre os quais o diagnóstico de LMA deve prevalecer, mesmo com contagem de células blásticas medulares inferiores a 20% (18).

O diagnóstico morfológico tem em conta a Classificação FAB (25,27), que contempla a contagem e caracterização das populações celulares encontradas nos esfregaços estudados, bem como a avaliação das suas características intracelulares, como a presença de Corpos de *Auer* (Figura 7) ou de alterações mielodisplásicas (35).

Os mieloblastos, monoblastos, ou promielócitos anormais devem ser contados como células blásticas; os monócitos anormais devem ser contados como monócitos, e os promonócitos devem ser considerados uma categoria separada, na contagem diferencial leucocitária. No entanto, em todas estas situações, as alterações morfológicas devem ser referidas no relatório analítico (35).

No diagnóstico da LMA podem ainda ser realizados estudos citoquímicos, que permitem a confirmação da linhagem envolvida (36).

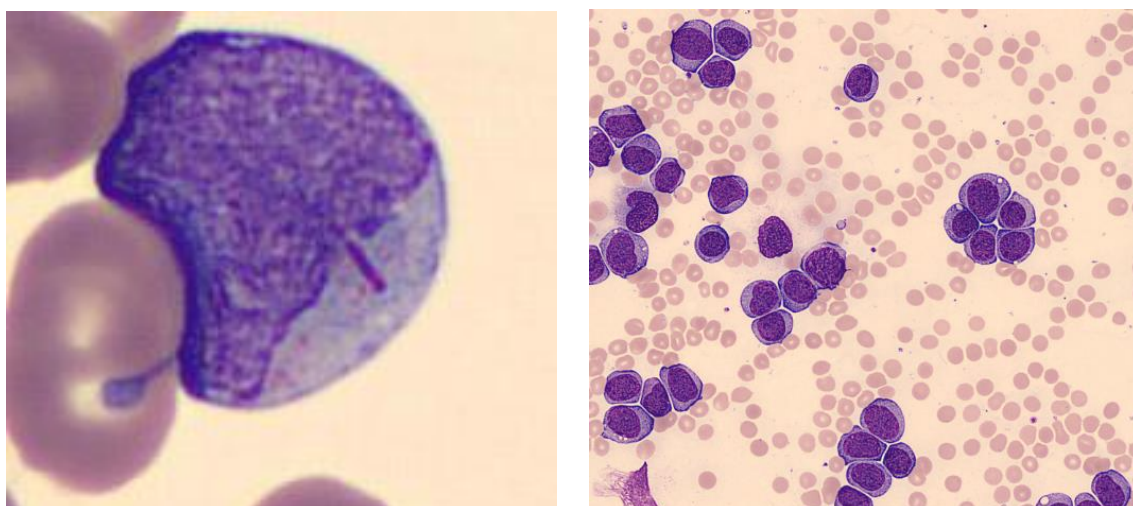


Figura 7 – Achados característicos de esfregaços de sangue periférico de doentes com LMA: célula blástica contendo um Corpo de *Auer* (à esquerda) e hiperleucocitose (à direita) (imagens obtidas pelo Microscópio Digital *CellaVision*® DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após *Coloração de May-Grünwald-Giemsa*).

3.1.1 Diferenciação entre LMA e Síndrome Mielodisplásica (SMD)

Um dos maiores desafios encontrados na clínica é a diferenciação entre LMA e SMD em crianças com baixas contagens de células blásticas, sendo necessária a realização de uma biópsia de medula óssea. Esta distinção é de extrema importância, uma vez que o tratamento da SMD inclui a Transplantação de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH), cuja celeridade é crítica para a sobrevivência das crianças (37). Em adultos é utilizado um limite de 20% de células blásticas para diferenciar estas duas entidades clínicas. Nas crianças, contudo, podem ser encontrados casos de SMD com 20 a 30% de células blásticas, nomeadamente na anemia refratária com excesso de células blásticas em transformação. A presença de alterações genéticas específicas, hiperleucocitose, presença de doença extramedular e rápida progressão da doença (2 a 4 semanas) são achados que suportam o diagnóstico de LMA, em detrimento de SMD (38).

3.2 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem por Citometria de Fluxo Multiparamétrica é o método de escolha para determinar a linhagem e caracterizar fenotipicamente os blastos leucémicos, através da utilização de painéis de anticorpos monoclonais, específicos de determinados marcadores celulares, conjugados com fluorocromos.

Esta etapa do diagnóstico laboratorial permite fazer a distinção entre a LLA e a LMA, ou definir uma Leucemia Aguda de Linhagem Ambígua (MPAL). Uma vez definida a LMA, a imunofenotipagem assume ainda um papel fundamental para o diagnóstico da LMA com diferenciação mínima (FAB-M0) e da leucemia megacarioblástica aguda (FAB-M7) (18).

A amplitude dos painéis de anticorpos deve ser tal, que permita identificar os diferentes tipos de LMA, de acordo com as classificações existentes, e detetar características imunológicas importantes, como a expressão aberrante ou a co-expressão de determinados antígenos, bem como variações de intensidade da sua expressão que possam ser utilizadas na deteção da Doença Residual Mínima (DRM) (39).

De acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), a contagem de células blásticas por Citometria de Fluxo (CD34+) não deve substituir a avaliação morfológica, uma vez que nem todas as células blásticas expressam o marcador CD34, e pode ocorrer interferência por hemodiluição ou por artefactos. Os marcadores essenciais para determinar a linhagem da leucemia aguda e identificar uma possível MPAL são os seguintes: MPO, lisozima, CD11c, CD14, CD64, iCD3, CD19, iCD22, iCD79 e CD10 (18).

O diagnóstico da LMA com diferenciação mínima (FAB-M0) é estabelecido com base na detecção de antígenos expressos nas fases iniciais da hematopoiese, nomeadamente o CD34, CD38 e o HLA-DR, paralelamente com a ausência de expressão de marcadores específicos de linhagem. Ainda que o resultado da reação citotóxica da MPO seja negativo, a análise por imunofenotipagem pode revelar expressão de mieloperoxidase intracelular (iMPO) em, pelo menos, uma parte das células blásticas (33).

No caso da leucemia megacarioblástica aguda (FAB-M7), são utilizados marcadores de glicoproteínas plaquetárias como o CD41 e/ou CD61 e, embora menos comum, o CD42. Nestes casos, é importante ter atenção à possibilidade de ocorrência de falsos positivos, resultantes da adesão plaquetária às células leucémicas, situação que pode ser detetada através da utilização da estratégia de *gating* CD45/SSC (40).

O painel mínimo obrigatório para obedecer aos critérios da OMS e do *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL), no que diz respeito ao diagnóstico da LMA, inclui os marcadores CD34, CD117, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65, i-MPO, *i-lysozyme*, CD41 e CD61 (18,41). O painel completo encontra-se representado na Tabela 5.

A seleção de um vasto painel de marcadores permite uma melhor orientação dos estudos moleculares subsequentes e, ainda mais importante, das opções terapêuticas para cada doente.

A uniformização dos painéis utilizados ainda não é consensual entre os vários grupos de estudo. No entanto, a inclusão do marcador CD45 em todos os painéis já é amplamente aceite, uma vez que, em conjunto com a informação do detetor de dispersão lateral do citómetro, permite uma melhor separação das células blásticas, relativamente às restantes populações de células normais (Figura 8) (42).

Atualmente, a abordagem mais aceite na interpretação dos dados da imunofenotipagem é a avaliação qualitativa da expressão antigénica, quer em termos de existência/ausência de fluorescência, quer de intensidade de fluorescência. As populações celulares que não apresentam expressão dos antígenos em estudo, na mesma amostra, servem, assim, de *cut-off* (43).

Tabela 5 – Painel de marcadores recomendado para o diagnóstico de crianças com LMA (32).

Marcadores de <i>Stem cells</i> e células progenitoras	CD34 ⁺ , CD117 ⁺ , CD133, HLA-DR
Marcadores mielomonocíticos	CD4, CD11b ⁺ , CD11c ⁺ , CD13 ⁺ , CD14 ⁺ , CD15 ⁺ , CD33 ⁺ , CD36, CD64 ⁺ , CD65 ⁺ , CD184 (CXCR4) [◊] , iMPO ⁺ , i-lysozyme ⁺
Marcadores megacariocíticos	CD41 ⁺ , CD42, CD61 ⁺
Marcadores eritroides	CD235a
Antigénio específico da Leucemia	Homólogo do NG2*
Antigénios aberrantes de linhagem	CD2 [◊] , CD7 [◊] , CD19 [◊] , CD56 [◊]
Marcadores panleucocitários	CD11a [◊] , CD45 [◊]

Expressão intracelular é representado pelo marcador precedido de “i”.

* A maioria dos casos com rearranjos no gene *KMT2A* expressa o homólogo do NG2, por reatividade com o anticorpo monoclonal 7.1.

† Painel mínimo obrigatório para o diagnóstico da LMA pediátrica.

◊ Marcadores com implicações no diagnóstico e na terapêutica.

CD, *Cluster of Differentiation*; HLA-DR, *Human Leucocyte Antigen D Related*; MPO, *Mieloperoxidase*; NG2, *Neural Glial Antigen 2*;

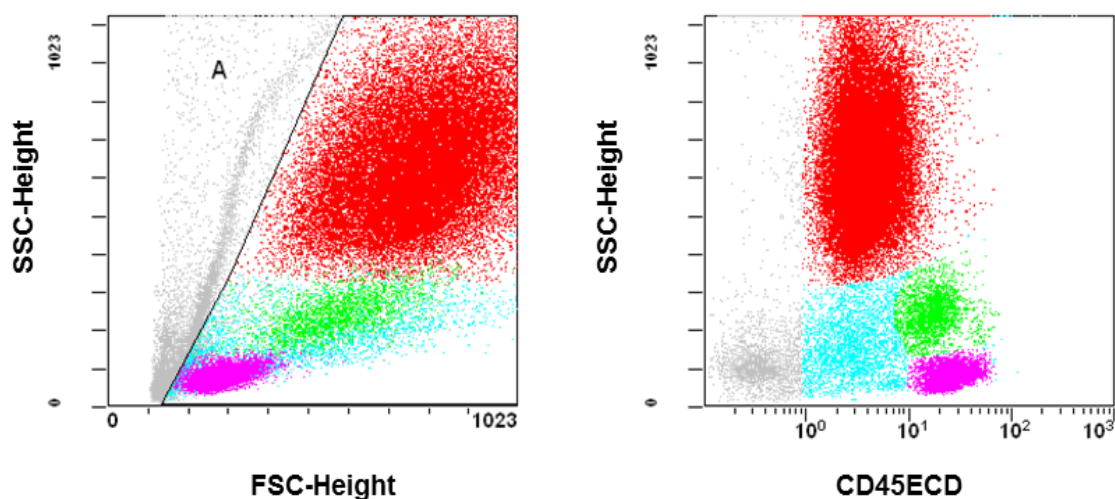


Figura 8 – Estratégias de gating FSC/SSC (à esquerda) e CD45/SSC (à direita) para separação das populações celulares. As células progenitoras hematopoiéticas encontram-se a azul. (adaptado de *Atlas of Flow Cytometry Patterns*, disponível em www.Leukemia-net.org).

No final desta etapa do diagnóstico, o fenótipo das células blásticas é definido atendendo à expressão dos vários marcadores testados, que pode, mais tarde, ser utilizado para monitorização do tratamento ou para deteção de DRM.

3.3 Citogenética

A abordagem citogenética no diagnóstico é semelhante para adultos e crianças (33). A análise convencional do cariótipo permite detetar anomalias citogenéticas estruturais e numéricas em 70-80% das crianças com LMA. Para deteção de determinados genes de fusão, produtos de translocações crípticas ou perda de material cromossómico, é necessário recorrer a técnicas de FISH (32).

Para estabelecer um diagnóstico de cariótipo normal ou anormal, é recomendada a observação, no mínimo, de 20 células em metafase em amostras de medula óssea. Para diagnosticar um cariótipo anormal podem ainda ser utilizadas amostras de sangue periférico (33).

Devem ser pesquisadas as alterações mais frequentes, como a $t(8;21)(q22;q22)$; *RUNX1-RUNX1T1* (Figura 9A), a $inv(16)(p13.1q22)$; *CBFB-MYH11* (Figura 9B), a $t(15;17)(q22;q21)$; *PML-RARA* (Figura 10A) e os rearranjos do 11q23; *KMT2A*, como, por exemplo, a $t(9;11)(p22;q23)$ (Figura 10B). Adicionalmente, devem ser consideradas outras alterações que, embora menos comuns, podem apresentar significado prognóstico e, conseqüentemente, implicações terapêuticas. São exemplo as alterações do cromossoma 5 e 7 e as alterações do 12p.

Segundos as recomendações da OMS, nos rearranjos do 11q23 (*KMT2A*), o parceiro do *KMT2A* deve ser pesquisado, uma vez que se relaciona com o prognóstico da doença (18). A $t(6;11)(q27;q23)$, a $t(10;11)(p11.2;q23)$ e a $t(1;11)(q21;q23)$ devem ser incluídas no diagnóstico dos doentes com LMA associada a rearranjos do 11q23 (44).

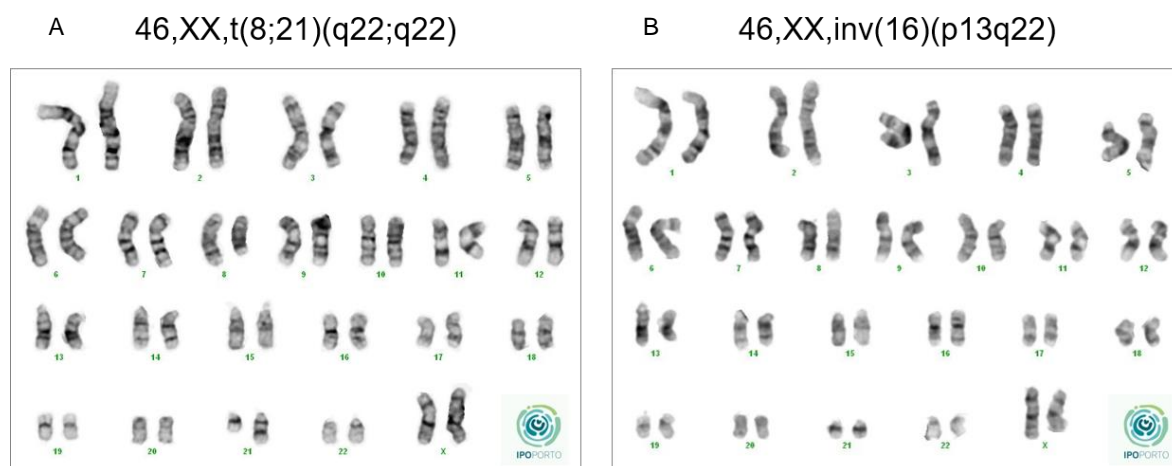


Figura 9 – Cariótipos com translocações frequentes na LMA pediátrica (imagens fornecidas pelo Serviço de Genética do IPO-Porto).

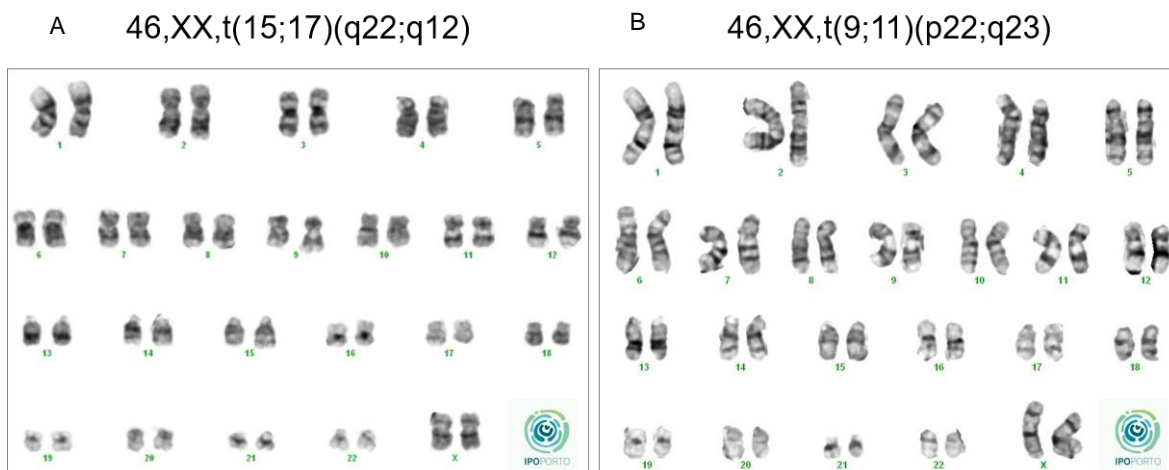


Figura 10 – Cariótipos com translocações frequentes na LMA pediátrica (imagens fornecidas pelo Serviço de Genética do IPO-Porto).

3.4 Genética Molecular

Alterações moleculares, como mutações génicas ou expressão aberrante de determinados genes, que não sejam detetáveis por técnicas convencionais de cariótipo, mas possuam relevância prognóstica, devem ser estudadas recorrendo a técnicas moleculares. Neste sentido, o diagnóstico da LMA pediátrica deve incluir, em particular para os casos de LMA-CN, o *screening* das mutações nos genes *NPM1*, *FLT3* (*FLT3*-ITD), *CEBPA* (bialélicas) e *KIT*, e a deteção de determinados rearranjos do *KMT2A* com significado prognóstico (Tabela 6) (23,44–47).

Uma vez que o significado prognóstico destas alterações depende do gene parceiro do *KMT2A*, a pesquisa dos genes de fusão mais importantes por técnicas de *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) deve ser incluída no diagnóstico (44).

A translocação críptica, envolvendo as regiões teloméricas dos cromossomas 11 e 5, responsáveis pela formação do gene de fusão *NUP98/NSD1*, impossibilita a sua deteção por técnicas convencionais de citogenética, devendo ser pesquisada por técnicas como o FISH ou o RT-PCR (48).

4 Prognóstico

A avaliação dos fatores de prognóstico permite alocar os doentes em grupos de risco e, assim, adequar a terapêutica utilizada, melhorando as taxas de sobrevivência e diminuindo a toxicidade associada.

Os fatores de prognóstico mais importantes para a sobrevivência de crianças com LMA são a resposta inicial ao tratamento e o tipo de alterações citogenéticas e moleculares responsáveis pela doença.

4.1 Estratificação do risco com base em alterações citogenéticas e moleculares

A informação proveniente dos estudos citogenéticos e moleculares permite estratificar os doentes, atendendo ao risco associado às alterações detetadas no doente e ao seu impacto na progressão da doença. Assim, os doentes podem ser considerados de alto risco, baixo risco e, no caso de não pertencerem a nenhum dos grupos anteriores, de risco intermédio.

O grupo de baixo risco, ou seja, de bom prognóstico, engloba um conjunto de alterações bastante estudadas que evidenciaram elevadas taxas de sobrevivência. A este grupo pertencem a $t(8;21)(q22;q22)$, *RUNX1-RUNX1T1*;, a $inv(16)(p13q22)$, *CBFB-MYH11*; e a $t(15;17)(q22;q21)$, *PML-RARA*;, a mutação no gene *NPM1* (sem mutação *FLT3-ITD*) e a mutação bialélica no gene *CEBPA* (17,29,49).

A $t(1;11)(q21;q23)$; *KMT2A-MLLT11* apresenta também bom prognóstico e, por isso, deve ser incluída no grupo de baixo risco (44).

O grupo de alto risco, também designado de risco adverso, ou de mau prognóstico, inclui alterações associadas a baixas taxas de sobrevivência. Alterações nos cromossomas 5 e 7, incluindo a monossomia 7, a presença de um cariótipo complexo (que pode ser definido por mais de 3 ou 5 alterações cromossómicas) e alterações no 12p, têm vindo a ser também apontadas como fatores de mau prognóstico (17,49).

As mutações *FLT3-ITD*, com elevado ratio ITD/WT, associam-se também a baixas taxas de sobrevivência, uma vez que se traduzem num aumento das taxas de recidiva (50). Quando em co-expressão com o gene de fusão *NUP98/NSD1*, o prognóstico é ainda mais reservado (51).

A sobre-expressão dos genes *EVI1* e *MEL1*, tem sido recentemente apontada como um fator de mau prognóstico (52).

A elevada contagem de leucócitos em doentes considerados de risco intermédio leva a que sejam agrupados na categoria de alto risco, devido a um elevado risco de insucesso terapêutico (53).

Mais recentemente, foi possível esclarecer o papel dos rearranjos do cromossoma 11q23 envolvendo o gene *KMT2A*, com grande prevalência na LMA na faixa etária pediátrica, nomeadamente em crianças com menos de dois anos. Este é um gene muito promíscuo, com inúmeros parceiros de translocação descritos. Um estudo em 750 crianças com LMA associada a rearranjos do *KMT2A*, mostrou que o prognóstico depende do gene parceiro envolvido. Assim, as translocações $t(4;11)(q21;q23)$, $t(6;11)(q27;q23)$, $t(10;11)(p12;q23)$, ou a $t(10;11)(p11.2;q23)$ associam-se a mau prognóstico (44).

O grupo de risco intermédio é constituído por todas as alterações que não as anteriormente referidas, contando cerca de 60 a 70% dos casos de LMA pediátrica (17).

Os estudos futuros deverão incidir nestas alterações, uma vez que o conhecimento do seu papel na patogénese da leucemia poderá permitir desenvolver estratégias terapêuticas inovadoras, melhorando o prognóstico.

4.2 Doença Residual Mínima (DRM)

A avaliação da resposta ao tratamento é conseguida através da deteção de DRM, ou seja, da presença de células leucémicas na medula óssea, após a terapêutica de indução. A deteção de DRM constitui, desta forma, um fator de mau prognóstico, indicando que o tratamento não foi eficaz na eliminação do clone leucémico. A Citometria de Fluxo é o método de eleição para avaliação da DRM, sendo que a deteção molecular de algumas mutações por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) também é uma área em progressão, ambas com elevada sensibilidade (54–56).

4.3 Outros fatores com significado prognóstico

O envolvimento do SNC no momento do diagnóstico é considerado um fator de mau prognóstico na LMA (57).

A expressão dos marcadores imunológicos CD7, CD56 e CD79a associa-se também com mau prognóstico, nomeadamente, com maior agressividade da doença e uma diminuição das taxas de remissão completa (58).

Na Tabela 6 está representada a definição dos grupos de LMA de baixo e alto risco, nas crianças, atendendo às alterações citogenéticas e moleculares, à avaliação da DRM após tratamento e à expressão de determinados marcadores aberrantes.

Tabela 6 – Estratificação do risco com base nas alterações citogenéticas e moleculares, na avaliação da DRM e na expressão aberrante de antígenos.

Grupo de risco	Baixo risco	Alto risco
Alterações citogenéticas	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22); <i>CBFB-MYH11</i> t(15;17)(q22;q21); <i>PML-RARA</i> t(1;11)(q21;q23); <i>KMT2A-MLLT11</i>	t(4;11)(q21;q23); <i>KMT2A-AFF1</i> t(6;11)(q27;q23); <i>KMT2A-AFDN</i> t(10;11)(p12;q23); <i>KMT2A-MLLT10</i> t(10;11)(p11.2;q23); <i>KMT2A-ABI1</i> Monossomia 7 Alterações do 5q e o do 7q Alterações do 12p Cariótipos complexos
Mutações génicas	Mutação no gene <i>NPM1</i> sem mutação <i>FLT3-ITD</i> Mutação no gene <i>CEBPA</i> (bialélica)	<i>FLT3-ITD</i> (elevado ratio ITD/WT)
Sobre-expressão génica		<i>EVI1</i> e <i>MEL1</i> (co-expressão) <i>NUP98-NSD1</i> (em associação com a mutação <i>FLT3-ITD</i>)
DRM	Não detetável	Detetável
Expressão aberrante de antígenos		CD7 CD56 CD79a

5 Tratamento

A sobrevivência das crianças com LMA tem vindo a aumentar devido a melhores cuidados de suporte, à estratificação do risco, com adaptação do tratamento e aos avanços observados com a quimioterapia. Atualmente, cerca de 80% dos doentes atinge a remissão completa. A sobrevivência a longo prazo varia entre os diferentes estudos, entre 30 a 60%, dependendo da terapêutica implementada (59,60).

Os agentes terapêuticos utilizados no tratamento da LMA têm como objetivo eliminar o clone leucémico, permitindo que as restantes populações medulares retomem valores normais. No entanto, estes agentes mielotóxicos apresentam baixa seletividade, o que significa que, paralelamente à eliminação das células malignas, há também eliminação de células das restantes linhagens. Assim, é necessária uma monitorização atenta do doente, podendo ser necessário transfundi-lo, para repor os valores de eritrócitos e plaquetas e, assim, permitir a continuação do tratamento (36).

O tratamento de primeira linha da LMA na criança consiste em quatro a cinco ciclos de quimioterapia. Nos primeiros três dias é administrada uma Antraciclina, geralmente a Daunorrubicina, e, nos sete dias seguintes, é administrada Citarabina. O tipo de Antraciclina utilizada varia entre os diferentes grupos de estudo, sendo que a Idarrubicina e a Mitoxantrona apresentam os resultados mais promissores (61–63).

No sentido de melhorar as taxas de remissão completa alcançadas, tem vindo a ser investigada a combinação do regime base com outros agentes terapêuticos, como a Etoposida, a Tioguanina, ou o Gemtuzumab Ozogamicina (GO) (60,64).

A intensificação das doses de Antraciclinas é uma das formas mais efetivas de aumentar as taxas de remissão completa. Além disso, a exposição a doses cumulativas mais elevadas de Antraciclinas está associada ao desenvolvimento de cardiomiopatias. Os mecanismos responsáveis pela cardiotoxicidade das Antraciclinas ainda não são bem conhecidos, mas uma das hipóteses mais aceites propõe o stress oxidativo associado a este tratamento como agente cardiotóxico (65). A utilização do Dexrazoxano, como agente cardioprotetor em neoplasias pediátricas, foi associada ao aparecimento de complicações secundárias, pelo que, atualmente, esta opção não é recomendada (66). A utilização de formulações lipossómicas de Antraciclinas, como a Daunorrubicina Lipossómica, com menor potencial cardiotóxico, parece ser vantajosa, em especial no tratamento da LMA com t(8;21) (67).

A melhor compreensão das alterações genéticas da LMA, nomeadamente das mutações com significado prognóstico, tem possibilitado a descoberta de novos agentes terapêuticos com ação a nível molecular. Nos últimos anos têm sido estudados novos compostos, como inibidores da tirosina cinase, agentes epigenéticos, ou compostos

ligados a anticorpos (68,69). Dos vários ensaios clínicos com novos agentes terapêuticos concluídos e a decorrer, os inibidores do *FLT3* e o GO são os agentes que se destacam como mais promissores (64,70–72).

A terapêutica de segunda linha – consolidação – pode consistir na continuação da quimioterapia ou na Transplantação de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH).

5.1 Transplantação de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH)

A TCPH é um procedimento que permite a reconstituição do sistema hematopoiético de um doente, através da utilização de células do próprio doente – auto-transplante – ou de um dador histocompatível, isto é, com semelhança molecular do *Human Leucocyte Antigen* (HLA) – alo-transplante. O alo-transplante pode ser de um familiar, frequentemente um irmão, ou de um dador não aparentado (73).

Nos doentes selecionados para TCPH, antes da intervenção, é frequente o uso de elevadas doses de quimioterapia (regimes de condicionamento), com o objetivo de destruir as células malignas. Embora ainda não esteja estabelecido qual o melhor regime terapêutico, a utilização de menores intensidades não parece alterar a sua eficácia (74).

A vantagem da TCPH em crianças diagnosticadas com LMA é discutível. É necessário contrabalançar os seus benefícios, nomeadamente a diminuição do número de recidivas, com a mortalidade inerente à intervenção, frequentemente associada com complicações infecciosas, à doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), e, ainda, com toxicidade do tratamento, a longo prazo (73).

Inicialmente, a existência de um dador histocompatível era o critério utilizado para a seleção dos doentes para TCPH. Contudo, com a emergência dos fatores de prognóstico e da estratificação do risco, a decisão da TCPH passou a ter também em conta o risco associado à LMA em cada criança (75).

Em crianças com LMA de prognóstico favorável, é consensual o tratamento de consolidação baseado na quimioterapia, sem necessidade de TCPH (76).

O papel da TCPH como opção terapêutica em crianças com LMA de alto risco ou de risco intermédio, em primeira remissão completa, é ainda muito controverso. Alguns estudos em doentes de risco intermédio apoiam esta opção terapêutica, enquanto outros não encontram benefícios (77,78). Em doentes com LMA de alto risco, a maior parte dos estudos não apoiam a utilização da TCPH (77,79). No entanto, a deteção de DRM após a terapêutica de indução, parece abrir portas para a sua utilização (80). Adicionalmente, alguns estudos sugerem que pode haver benefícios em subgrupos específicos de LMA na criança, com determinadas alterações moleculares de mau prognóstico (48,52).

Em doentes pediátricos em recidiva, após a segunda remissão, a TCPH é o tratamento de consolidação de eleição (67,81).

A TCPH recorrendo a células do próprio doente constitui uma possibilidade para doentes em primeira remissão completa, mas sem dador histocompatível. No entanto, parece não apresentar benefícios relativamente às restantes opções terapêuticas, uma vez que, para além da toxicidade inerente aos regimes de condicionamento necessários, apresenta taxas de recidiva superiores e não possui efeito anti-leucémico (*graft-versus-leukemia effect*) (73).

5.2 Terapêutica de suporte

A terapêutica de suporte é uma área em que os avanços têm contribuído para um aumento das taxas de sobrevivência das últimas décadas.

A hiperleucocitose (isto é, a presença de $\geq 100 \times 10^9$ leucócitos/L) é considerada uma emergência médica, devido ao elevado risco de complicações, como a leucoestase pulmonar, hemorragias, isquemia no SNC e Síndrome de Lise de Tumor (SLT), que podem ser fatais. Os doentes com LMA que apresentam hiperleucocitose devem, por isso, ser alvo de monitorização atenta e hidratação contínua e iniciar a quimioterapia logo que possível (82). Deve também ser administrada Rasburicase, para prevenir a hiperuricemia, concomitante com o desenvolvimento da SLT (83). A citorredução recorrendo a Leucaferese é controversa e parece não aumentar a sobrevivência dos doentes (84).

As complicações infecciosas, de natureza bacteriana e fúngica, são um achado muito comum entre as crianças com LMA. Os agentes bacterianos mais comuns são o *S. viridans* e bactérias gram-negativo, enquanto que os fungos do género *Candida* e *Aspergillus* são a causa mais frequente de infeções invasivas. Para prevenir estas infeções é frequentemente recomendado o tratamento profilático, recorrendo a agentes antimicrobianos e a fatores de crescimento hematopoiéticos (85,86).

5.3 Tratamento e Profilaxia do envolvimento do SNC

A quimioterapia sistémica, utilizada no tratamento da LMA, não apresenta a eficácia desejada na eliminação de células leucémicas presentes no SNC, o que justifica que na abordagem terapêutica inicial, nestes casos, se inclua um tratamento específico (32). Este tratamento consiste na administração de quimioterapia intratecal, recorrendo a Citarabina ou a Metotrexato, ou à combinação destes agentes com Hidrocortisona (quimioterapia tripla). Estudos recentes sugerem que a quimioterapia tripla apresenta benefícios sobre a utilização de Citarabina (34).

A utilização da irradiação intracraniana tem vindo a ser abandonada pelos vários grupos de estudo da LMA, devido aos efeitos adversos verificados com este tratamento em doentes com LLA, nomeadamente o risco de toxicidade a longo prazo e de neoplasias secundárias (87).

Os resultados da utilização de elevadas doses de Citarabina, ou de outros fármacos que conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica, tem contribuído para a preferência pela quimioterapia intratecal (34). Estudos recentes indicaram que, mesmo com envolvimento do SNC no momento do diagnóstico, a quimioterapia sistémica e intratecal é suficiente (57).

5.4 Tratamento de recidivas

As recidivas refletem o insucesso terapêutico, ocorrendo em cerca de 30 a 40% das crianças com LMA, das quais apenas aproximadamente um terço sobrevive (88).

A reativação do clone leucémico ocorre maioritariamente na medula óssea, podendo ocorrer, em 5% dos doentes, no SNC (62).

O tratamento da recidiva consiste em um a dois ciclos de quimioterapia de reindução e, eventualmente, TCPH, assim que seja atingida a segunda remissão completa, ou em situações de aplasia medular (81).

Relativamente ao regime de reindução não existe consenso sobre os agentes terapêuticos a utilizar. Estudos realizados na Europa têm apontado a utilização combinada de Fludarabina + dose elevada de Citarabina + Fator de Crescimento dos Granulócitos (conjuntamente designados de FLAG) e Daunorrubicina Lipossomal no primeiro curso, como sendo a abordagem terapêutica com melhor resposta, particularmente no subgrupo das LMA-CBF (88).

A utilização de elevadas doses de Antraciclinas nesta fase do tratamento não é recomendada, uma vez que a dose cumulativa de todo o percurso terapêutico, excede os 400mg/m², que poderá determinar problemas associados à sua cardiotoxicidade, no futuro (89).

A duração da remissão inicial, o cariótipo ao diagnóstico e a resposta à terapêutica de indução constituem informações com valor de prognóstico, que podem prever a resposta à terapêutica de reindução. Estudos recentes sugerem ainda que doentes com uma boa resposta ao tratamento de reindução (\leq de 20% de células blásticas na medula óssea), revelam um melhor prognóstico (90).

6 Subgrupos específicos de LMA

6.1 LMA em crianças com menos de 2 anos

A LMA em crianças com menos de 2 anos apresenta características clínicas e biológicas distintas, quando comparada com a LMA em crianças mais velhas, sendo a LMA bastante mais frequente neste subgrupo, ultrapassando a prevalência da LLA. O envolvimento extramedular, em particular no SNC, a hiperleucocitose e o predomínio dos subtipos M4, M5 e M7, são algumas das características clínicas que distinguem este subgrupo (91).

Relativamente à citogenética, nesta faixa etária, os rearranjos do 11q23 são a alteração mais frequente, sendo também comuns os cariótipos complexos e a $t(1;22)(p13;q13)$. Contrariamente ao que se passa nas crianças mais velhas, as translocações associadas a bom prognóstico, como as LMA-CBF e a $t(15;17)$, são muito pouco frequentes. Os casos de LMA-CN são raros e as alterações do 12p são mais prevalentes em crianças com menos de um ano (91,92). A $t(7;12)(q36;p13)$ e a $t(7;12)(q22;p13)$ são exclusivas deste grupo etário (93).

No que diz respeito a alterações moleculares, existem também diferenças. As mutações nos genes *NPM1* e *CEBPA*, de bom prognóstico, são eventos raros; as mutações *FLT3*-ITD são pouco frequentes; e as *FLT3*-TKD são mais frequentes do que nas crianças mais velhas. O transcrito de fusão *CBFA2T3-GLIS2*, de mau prognóstico, é mais frequentemente detetado neste subgrupo (94).

No geral, a LMA em crianças com menos de dois anos, apresenta características consideradas de mau prognóstico e, raramente, associa características de bom prognóstico. Por outro lado, uma característica que confere melhor prognóstico é o predomínio dos subtipos M4 e M5 (95). Apesar destas características, estas crianças apresentam taxas de sobrevivência sobreponíveis às verificadas no restante grupo pediátrico (91,94).

A abordagem terapêutica é semelhante para toda a faixa etária pediátrica. No entanto, a metabolização menos eficaz de determinados fármacos, como a citarabina, bem como a imaturidade pulmonar, hepática e cerebral, coloca as crianças com menos de dois anos numa situação de maior suscetibilidade à ação tóxica destes agentes, sendo necessário ajustar as doses terapêuticas ao peso corporal (mg/kg) (91,96,97). A TCPH tem sido utilizada como parte da terapêutica de consolidação, mas os seus benefícios têm vindo a ser questionados (91,94).

Os estudos futuros devem incidir sobre os diferentes subtipos de LMA nestas crianças, na tentativa de clarificar quais poderão beneficiar de um tratamento mais agressivo, incluindo a TCPH (97).

6.2 LMA associada à Síndrome de Down

As crianças com Síndrome de *Down* (SD), ou trissomia 21, apresentam um risco 10 a 20 vezes mais elevado de desenvolver leucemia, e uma probabilidade ainda maior de desenvolver leucemia megacarioblástica aguda. Na verdade, cerca de metade dos casos são diagnosticados com leucemia mieloide com características megacarioblásticas (LM-SD), que pode, ou não, ser precedida por Síndrome Mieloproliferativa Transitória (SMT), também designada por leucemia transitória, um achado característico deste subgrupo de doentes (98).

A SMT ocorre em aproximadamente 10% dos recém-nascidos com SD, caracterizando-se pela acumulação de megacarioblastos imaturos no fígado, sangue periférico e medula óssea (99). Anemia, trombocitopenia e células blásticas observadas em esfregaços de sangue periférico, são os achados mais frequentes da SMT. O caráter transitório desta Síndrome resulta, na maioria dos casos, da resolução espontânea até aos três meses de vida. Em cerca de 10 a 30% dos casos, estas crianças desenvolvem LM-SD até aos 4 anos de idade, que, quando corretamente diagnosticada, apresenta alta sensibilidade à quimioterapia de baixa intensidade e um prognóstico favorável (100).

Contudo, a SMT nem sempre é benigna, podendo associar complicações graves, como *hydrops fetalis* (101). A taxa de mortalidade, embora baixa, justifica que sejam realizados hemogramas em todos os recém-nascidos diagnosticados com SD e durante o primeiro mês de vida, de acordo com as recomendações da Academia Americana de Pediatras (102).

As células blásticas encontradas nas crianças com SMT e LM-SD apresentam características morfológicas e imunofenotípicas semelhantes. Valores anormais de plaquetas, hiperleucocitose e valores mais elevados de células blásticas no sangue periférico do que na medula óssea, são alguns dos achados característicos. O perfil imunofenotípico destas células blásticas é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Perfil imunofenotípico das células blásticas encontrados nas crianças com SMT e LM-SD (103).

	Marcadores comuns	Outros marcadores
SMD	CD117, CD13, CD33, CD7, CD4 [†] , CD41, CD42, TPO-R, IL-3R, CD36, CD61, CD71	CD34, CD56
LM-DS		CD34 ⁺ , CD56 [‡] , CD41 [‡]

[†]em apenas 50% dos casos.

[‡]expressão fraca.

[‡]negativo em 30% dos casos.

Mutações somáticas, envolvendo o gene *GATA1*, que codifica um fator de transcrição importante para a megacariocitopoiese e para a eritropoiese, têm sido

detetadas exclusivamente em doentes com SD e com leucemia megacarioblástica aguda ou SMT. Este gene está ligado ao cromossoma X e é essencial para a diferenciação eritroide e megacariocítica. Deleções, inserções ou duplicações no exão 2 do *GATA1*, levam à introdução de um codão *stop*, e, conseqüente expressão de uma proteína anormal (de cadeia polipeptídica mais curta), designada GATA1s. Esta proteína, que perdeu o seu domínio de ativação N-terminal, apresenta a capacidade de transativação comprometida, contribuindo para a proliferação descontrolada dos megacariócitos imaturos (104).

As mutações no *GATA1* parecem resultar da maior suscetibilidade do DNA, decorrente da interação entre genes localizados no cromossoma 21 adicional (*cystathionine-β-synthase* e *superóxido dismutase*), que estão envolvidos na acumulação de uracilo, resultante de alterações no metabolismo dos folatos, e no aumento do stress oxidativo. Por outro lado, o comprometimento dos mecanismos de reparação do DNA nos doentes com SD, pode também assumir um papel no desenvolvimento da LM-SD (104).

O facto destas mutações não serem detetadas em doentes em remissão, sustenta a sua especificidade, indicando que o *GATA1* pode ser utilizado como marcador para detetar DRM em doentes com SMT anterior, ou para monitorizar a terapêutica em doentes com leucemia megacarioblástica aguda e SD. A deteção de mutações deste gene pode ainda auxiliar no diagnóstico da leucemia megacarioblástica aguda, associada à SD, em situações de mielofibrose ou mielodisplasia (105,106).

A terapêutica aplicada na LM-DS não é a mesma para todas as idades. Para crianças com menos de 4 anos, a utilização de quimioterapia de reduzida intensidade resulta em taxas de sobrevivência bastante altas, sem necessidade de correr a TCPH. Por razões desconhecidas, crianças com mais de 4 anos apresentam pior prognóstico, necessitando de doses mais intensas de quimioterapia, semelhantes às administradas a crianças com leucemia megacarioblástica aguda sem SD (107).

As crianças com leucemia megacarioblástica aguda, com diagnóstico anterior de SMT, apresentam um melhor prognóstico, relativamente às que não desenvolveram SMT (108).

6.3 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

A LPA, apesar de rara na criança, constitui um subgrupo de bom prognóstico, devido à elevada eficácia da terapêutica instituída. No entanto, devido ao elevado risco de hemorragias, é considerada uma emergência médica (109).

Esta doença resulta da bem conhecida *t(15;17)(q22;q21)*, que tem como consequência um rearranjo do 17q21, provocando a fusão do *RARA*, gene do recetor do ácido retinóico, com o gene *PML*, na maioria dos casos.

O diagnóstico da LPA é frequentemente baseado na morfologia característica dos blastos leucémicos, com predomínio de promielócitos. Apesar disto, é consensual a sua confirmação a nível genético. O perfil imunofenotípico ou a presença de coagulopatias severas são também revelantes. Os estudos genéticos permitem, não só confirmar a presença do gene de fusão *PML-RARA*, como detetar outros rearranjos que não o *PML-RARA*, que são resistentes à terapêutica com ácido all-trans retinóico (ATRA) (110).

A terapêutica de referência consiste na administração de ATRA em conjunto com quimioterapia convencional. Apesar das taxas de sobrevivências alcançadas com este regime serem bastante elevadas, a faixa etária pediátrica evidencia mais efeitos secundários ao tratamento. Torna-se assim necessário, no futuro, encontrar abordagens igualmente eficazes e menos tóxicas (76).

O trióxido de arsénio (ATO) é outro agente frequentemente associado ao sucesso terapêutico da LPA, induzindo a diferenciação parcial e a apoptose das células da LPA. A sua eficácia terapêutica é comparável, ou superior, à da terapêutica de referência, apresentando, por outro lado, limitada atividade mielosupressora (111,112).

O alo-transplante, a partir de células de um dador histocompatível, é reservado apenas para os doentes que não consigam atingir a remissão completa após a terapêutica de consolidação. Em doentes sem dador compatível, ou nos quais a TCPH é desaconselhada, são utilizados agentes como o ATO (76).

Ambos os agentes (ATRA e ATO) podem cursar com o desenvolvimento de síndrome de diferenciação da LPA, que pode ser tratado com corticosteroides, nomeadamente dexametasona (113).

7 Crianças diagnosticadas com LMA no IPO-Porto entre janeiro de 2014 e junho de 2016

7.1 Incidência

Entre janeiro de 2014 e junho de 2016 foram diagnosticados dezasseis novos casos de LMA pediátrica no IPO-Porto, sendo o maior número de casos diagnosticado em 2015. Nos anos de 2014 e 2015, foram diagnosticadas, em média, sete crianças por ano, o que correspondeu a 13% dos diagnósticos totais de neoplasias em crianças. No primeiro semestre de 2016, apenas duas crianças foram diagnosticadas com LMA, perfazendo um total de 7% dos diagnósticos totais (Figura 11).

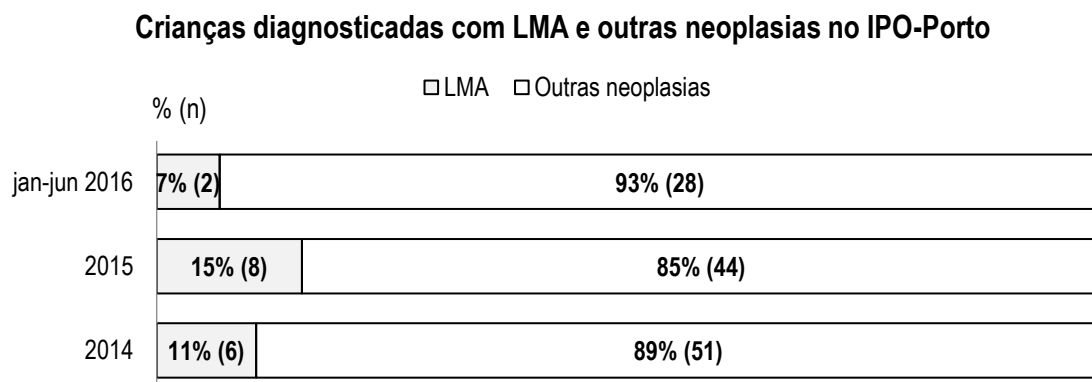


Figura 11 - Crianças diagnosticadas com LMA e outras neoplasias no IPO-Porto, entre janeiro de 2014 e junho de 2016 (Fonte: IPO-Porto).

Dentro das Leucemias Agudas, a LMA foi responsável por 21% dos casos em 2014, 25% dos casos em 2015 e, no primeiro semestre de 2016, por 15% dos casos (Figura 12).

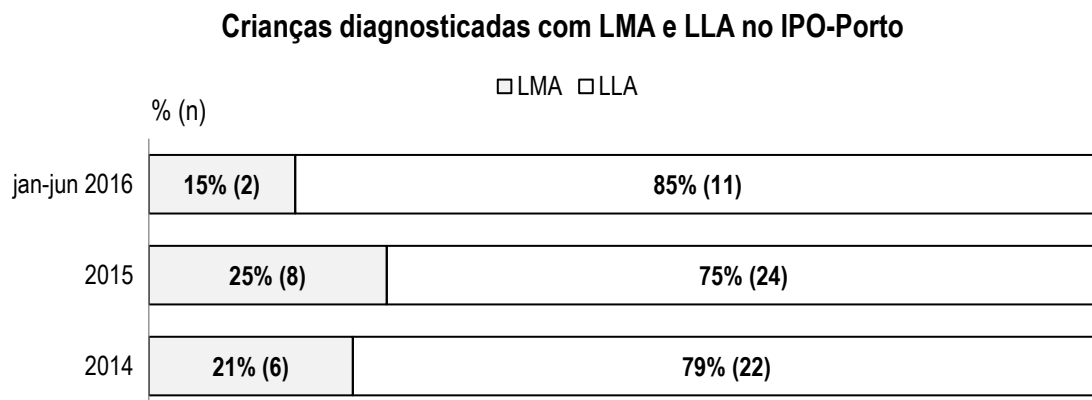


Figura 12 – Crianças diagnosticadas com LMA e LLA no IPO-Porto entre janeiro de 2014 e junho de 2016 (Fonte: IPO-Porto).

Relativamente ao subgrupo de crianças com menos de dois anos, a LMA representa uma maior percentagem dos diagnósticos, em concordância com a literatura. Em 2014 não houve diagnósticos de LMA nesta faixa etária. Em 2015 foram diagnosticadas quatro crianças com menos de dois anos no IPO-Porto, sendo a LMA responsável por três dos diagnósticos, 75% dos casos. No primeiro semestre de 2016, em três diagnósticos de neoplasias, um deles foi de LMA, tendo sido responsável por 33% dos casos (Figura 13). Nesta faixa etária, o número de casos de LMA é superior aos de LLA, sendo que, entre janeiro de 2014 e junho de 2016, apenas uma criança com menos de dois anos foi diagnosticada com LLA.

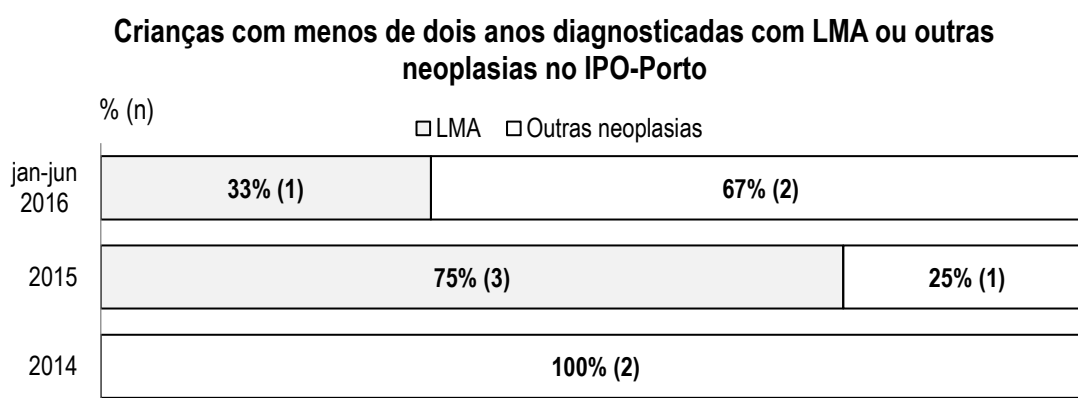


Figura 13 – Crianças com menos de dois anos diagnosticadas com LMA ou outras neoplasias no IPO-Porto entre janeiro de 2014 e junho de 2016 (Fonte: IPO-Porto).

7.2 Casos clínicos

Esta parte do trabalho tem como objetivo ilustrar alguns casos de estudo, de crianças diagnosticadas com LMA no IPO-Porto, entre janeiro de 2014 e junho de 2016. Durante o estágio no IPO-Porto, houve oportunidade de acompanhar de perto a rotina dos Laboratórios de Hematologia e de Citometria de Fluxo, onde se realizam as primeiras etapas do diagnóstico laboratorial da LMA. O estágio de Hematologia Laboratorial incidiu essencialmente na análise de amostras de sangue periférico (hemograma e observação microscópica de esfregaços sanguíneos), pelo que não é incluída nesta secção a informação proveniente de amostras de medula óssea.

O Serviço de Hematologia Laboratorial está equipado com a cadeia de Autoanalisadores Hematológicos *Sysmex®* XN-9000, que realiza os hemogramas e que inclui um equipamento de execução de esfregaços e colorações automáticas, e com o Microscópio Digital *CellaVision®* DM96, onde são visualizadas as lâminas de esfregaços sanguíneos. O Laboratório de Citometria de Fluxo do Serviço de Imunologia, utiliza o Citómetro de Fluxo *BD FACSCanto™* II para a imunofenotipagem das LMA, que permite a utilização de 8 fluorocromos em simultâneo. Os painéis de marcadores utilizados seguem as recomendações do grupo EuroFlow (114).

A seleção dos casos clínicos a incluir neste trabalho baseou-se no significado prognóstico das alterações encontradas, sendo abordados casos de bom e mau prognóstico. Assim, dos dezasseis casos de LMA diagnosticados entre janeiro de 2014 e junho de 2016, são apresentados cinco casos clínicos. Para cada um, é fornecida a informação clínica, o hemograma, incluindo a morfologia celular do esfregaço sanguíneo e a contagem diferencial leucocitária, o perfil imunofenotípico das células leucémicas, os resultados dos estudos citogenéticos e moleculares e o diagnóstico final.

Caso 1

Criança de 9 meses, sexo masculino, transferida de uma Unidade de Saúde da Região Norte para o IPO-Porto, por suspeita de leucemia.

Sintomatologia: diarreia, febre, palidez e rinorreia escassa. Orofaringe ligeiramente ruborizada, com algumas petéquias no palato.

Uma vez no IPO, foi realizado um hemograma, acompanhado do estudo morfológico do esfregaço de sangue periférico. Foram também realizados estudos imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares.

O hemograma, representado na Figura 14, revelou anemia normocrômica normocítica, ligeira anisocitose, trombocitopenia, presença de plaquetas gigantes e hiperleucocitose. No gráfico de dispersão detetou-se uma população celular numerosa, de intensa fluorescência, compatível com células blásticas. A contagem diferencial leucocitária revelou um predomínio de células blásticas e de monócitos, bem como a presença de precursores mieloides.

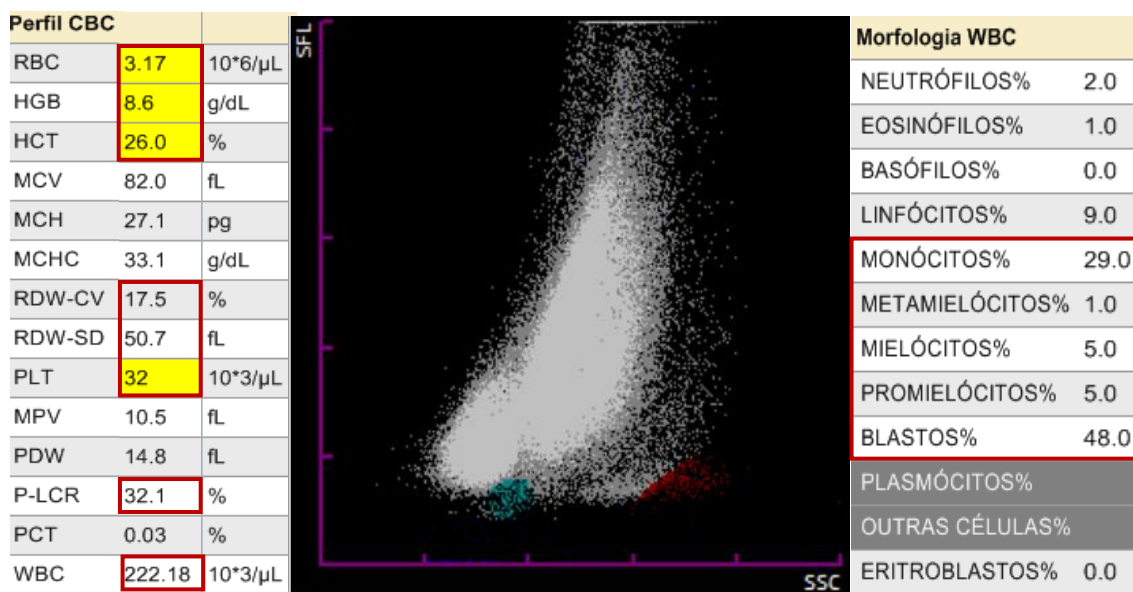


Figura 14 - Hemograma do doente - caso 1 (Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000).

O estudo morfológico do esfregaço sanguíneo confirmou a presença de células blásticas de grandes dimensões evidenciado por vezes nucléolos, com granulação citoplasmática azurófila variável (Figura 15). Observou-se também um grande número de células monocitóides, com cromatina reticulada, e com citoplasma vacuolizado, podendo apresentar granulação azurófila bem visível (Figura 16).

O estudo imunofenotípico (Tabela 8) revelou a expressão de marcadores mieloides, como o CD13 e o CD33, e de marcadores monocíticos, como o CD14 e o CD64, e a ausência de expressão de marcadores de linhagem linfóide, com exceção do CD4 e do

CD56. A expressão do CD4 é frequentemente associada a células monocitóides. O estudo imunofenotípico do LCR revelou a presença de 4% de células blásticas de caraterísticas mieloides.

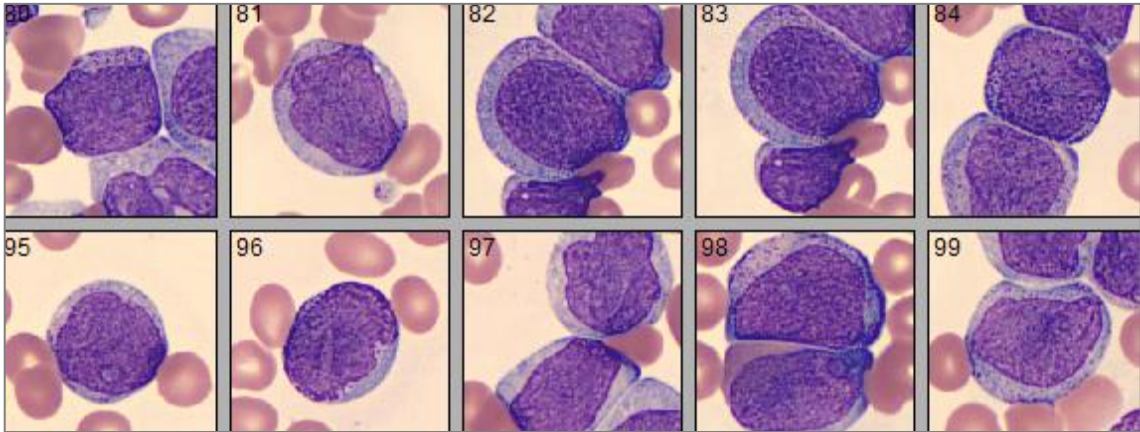


Figura 15 – Morfologia das células blásticas observadas no esfregaço sanguíneo do doente – caso 1 (imagens obtidas pelo *CellaVision®* DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após Coloração de *May-Grünwald-Giemsa*).

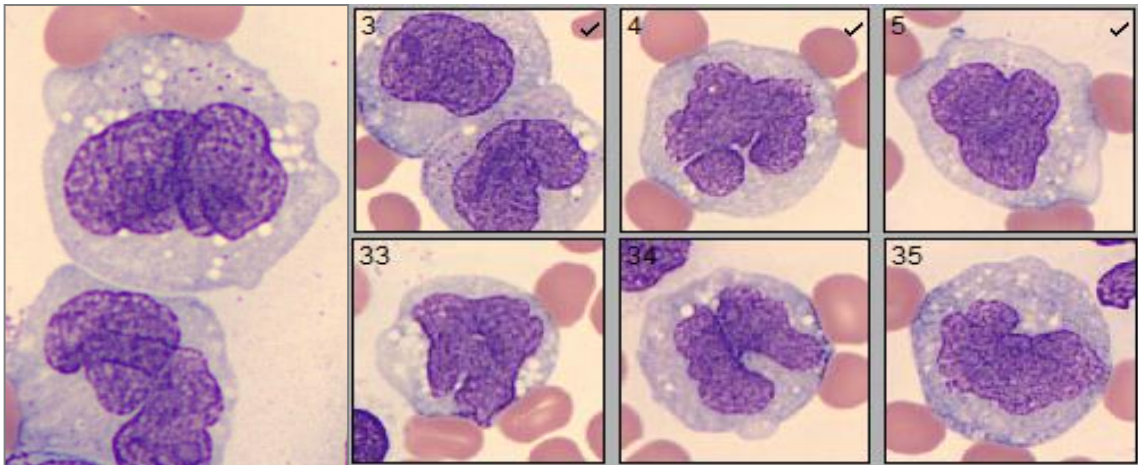


Figura 16 – Morfologia das células monocitóides observadas no esfregaço sanguíneo do doente – caso 1 (imagens obtidas pelo *CellaVision®* DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após Coloração de *May-Grünwald-Giemsa*).

Tabela 8 – Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 1 (Fonte: IPO-Porto).

Marcadores de linhagem linfoide	CD2- cCD3- CD4+* CD7- CD10- CD19- CD20- CD22- CD56-/+* cCD79a-
Marcadores mielomonocíticos	CD11b-/+ CD13+/++ CD14-/++ CD15-/++ CD16-/++ CD33+/++ CD36-/+ CD64+/++ CD65-/+ CD123+ MPO+
Marcadores de <i>stem cells</i> e células progenitoras	CD34- CD117- HLA-DR-/+ TdT-
Outros marcadores	CD38+ NG2-

CD, *Cluster of Differentiation*; HLA-DR, *Human Leucocyte Antigen D Related*; LCR, Líquido Cefalorraquidiano; MPO, Mieloperoxidase; NG2, *Neural Antigen 2*; TdT, *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*.

* Marcadores aberrantes de linhagem;

As características morfológicas das células observadas no esfregaço sanguíneo, em conjunto com as características imunofenotípicas, são compatíveis com uma LMA-M4, segundo a Classificação FAB.

Os resultados do estudo citogenético e molecular encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 1 (Fonte: IPO-Porto).

Citogenética	Cariótipo: em vinte células analisadas foi encontrada a t(1;11)(q21;q23). FISH: em 96% das células analisadas foi detetada uma translocação envolvendo o gene <i>KMT2A</i> .
Genética molecular	RT-PCR qualitativo: foi detetada a presença do RNA de fusão <i>KMT2A-MLLT11</i> . Sequenciação Automática: não foi detetada a mutação <i>FLT3-ITD</i> .

FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*; RNA, *Ribonucleotide Acid*; RT-PCR, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*;

Atendendo à combinação da informação das diferentes áreas de estudo, foi diagnosticada LMA com t(1;11)(q21;q23); *KMT2A-MLLT11*, que está associada a bom prognóstico.

Caso 2

Adolescente de 13 anos, sexo masculino, transferido de um Hospital da Região Norte para o IPO-Porto por suspeita de leucemia

Sintomatologia: febre, tosse, perda ponderal, anorexia, palidez, adenopatias submandibulares bilaterais e hepatomegalia.

Uma vez no IPO, foi realizado um hemograma, acompanhado do estudo morfológico do esfregaço de sangue periférico. Foram também realizados estudos imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares.

O hemograma, representado na Figura 17, revelou anemia normocrômica normocítica, trombocitopenia, presença de plaquetas gigantes e hiperleucocitose. No gráfico de dispersão detetou-se uma população celular numerosa, de intensa fluorescência, compatível com células blásticas. A contagem diferencial leucocitária revelou um predomínio de células blásticas.

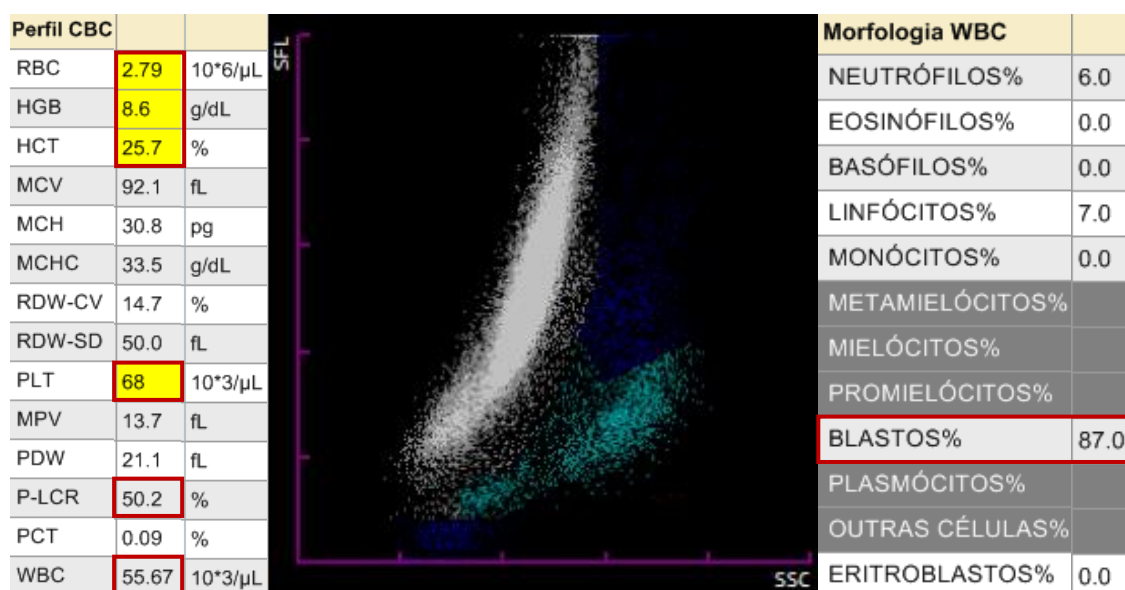


Figura 17 – O Hemograma do doente – caso 2 (Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000).

O estudo morfológico do esfregaço sanguíneo confirmou a presença de células blásticas, evidenciando por vezes grandes nucléolos, elevada razão núcleo:citoplasma, basofilia moderada e presença de Corpos de Auer (Figura 18).

O estudo imunofenotípico (Tabela 10) revelou expressão de marcadores mieloides, como o CD13, o CD33 e a MPO, e ausência de expressão de marcadores de linhagem linfóide, com exceção do marcador aberrante CD7, associado a mau prognóstico.

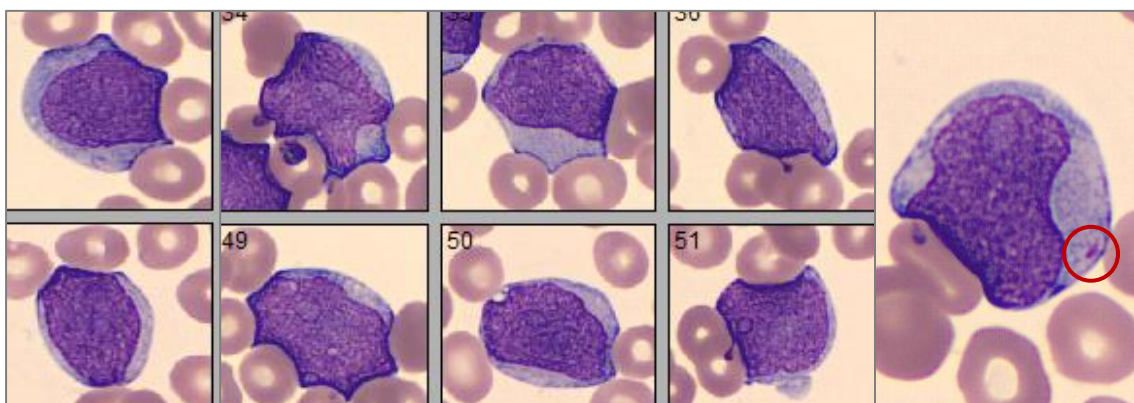


Figura 18 – Morfologia das células blásticas presentes no esfregaço sanguíneo do doente – Caso 2 (imagens obtidas pelo *CellaVision®* DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após Coloração de *May-Grünwald-Giemsa*).

Tabela 10 – Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 2 (Fonte: IPO-Porto).

Marcadores de linhagem linfoide	CD2- CD3- CD7-/± [‡] CD10- CD19- CD20- CD56- cCD79a-
Marcadores mielomonocíticos	CD11b-/± CD13+ CD14- CD15-/± CD16- CD33+ CD36- CD64-/± MPO+
Marcadores de <i>stem cells</i> e células progenitoras	CD34++ CD117+ HLA-DR++ TdT-
Outros marcadores	CD38+ CD45+ NG2-

CD, *Cluster of Differentiation*; HLA-DR, *Human Leucocyte Antigen D Related*; MPO, Mieloperoxidase; NG2, *Neural Antigen 2*; TdT, *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*.

[‡] Marcadores aberrantes de linhagem;

As características morfológicas das células observadas no esfregaço sanguíneo, em conjunto com a expressão de Mieloperoxidase (MPO), são compatíveis com uma LMA-M1, segundo a Classificação FAB.

Os resultados do estudo citogenético e molecular encontra-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 2 (Fonte: IPO-Porto).

Citogenética	Cariótipo: em vinte células analisadas foi encontrada a t(4;18)(q12;q22). FISH: não foi detetada nenhuma translocação envolvendo o gene <i>KMT2A</i> , nem nenhum rearranjo envolvendo o gene <i>PDGFRA</i> (cromossoma 4q12).
Genética molecular	RT-PCR qualitativo: sem deteção dos RNA de fusão mais frequentes. Sequenciação Automática: foi detetada a mutação <i>FLT3</i> -ITD e não foram encontradas mutações envolvendo o gene <i>NPM1</i> .

FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*; RNA, *Ribonucleotide Acid*; RT-PCR, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*;

Atendendo à combinação da informação das diferentes áreas de estudo, foi diagnosticada LMA com mutação *FLT3*-ITD, que está associada a mau prognóstico.

Caso 3

Criança de 11 meses, sexo feminino, transferida de um Hospital da Região Norte para o IPO-Porto, por suspeita de leucemia.

Sintomatologia: febre e palidez; sem organomegalias palpáveis.

Uma vez no IPO, foi realizado um hemograma, acompanhado do estudo morfológico do esfregaço de sangue periférico. Foram também realizados estudos imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares.

O hemograma, representado na Figura 19, revelou anemia normocrômica normocítica, ligeira anisocitose, trombocitopenia e hiperleucocitose. No gráfico de dispersão detetou-se uma população celular numerosa, de intensa fluorescência, compatível com células blásticas. A contagem diferencial leucocitária revelou neutropenia acentuada, predomínio de células blásticas e ainda a presença de mielócitos.

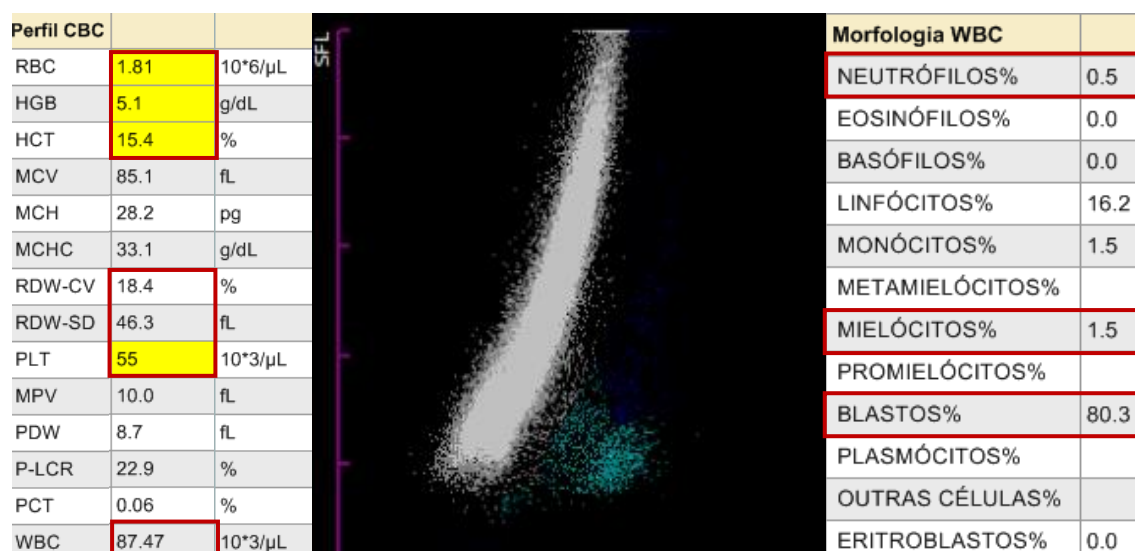


Figura 19 – Hemograma do doente – caso 3 (Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000).

O estudo morfológico do esfregaço sanguíneo confirmou a presença de células blásticas, apresentando elevado pleomorfismo, núcleo de contornos irregulares, cromatina reticulada, evidenciando por vezes nucléolos, elevada razão núcleo:citoplasma e basofilia moderada (Figura 20).

O estudo imunofenotípico (Tabela 12) revelou, por um lado, expressão de alguns marcadores mielomonocíticos como o CD33 e o CD64, e ausência de outros, como o CD13 e a MPO. Revelou ainda ausência de expressão de marcadores de linhagem linfóide, com exceção dos marcadores aberrantes CD7 e CD19, de mau prognóstico, e ausência de expressão dos marcadores CD34 e CD117. Estas características imunofenotípicas, em associação com os achados morfológicos, indicam uma possível LMA-M0, segundo a

Classificação FAB. Adicionalmente, os resultados da imunofenotipagem revelaram expressão do marcador NG2, frequentemente associado a LMA com rearranjos do *KMT2A*.

Os resultados do estudo citogenético e molecular encontra-se na Tabela 13.

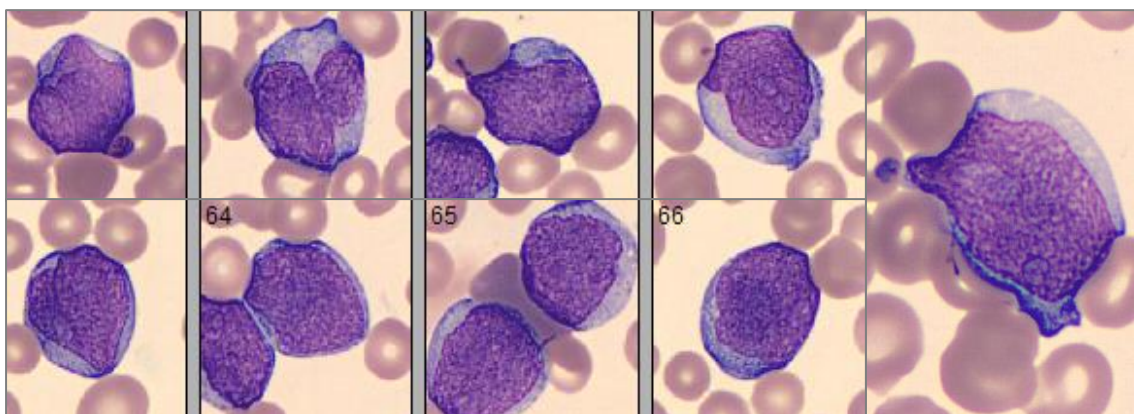


Figura 20 – Morfologia das células blásticas presentes no esfregaço sanguíneo do doente – Caso 3 (imagens obtidas pelo *CellaVision®* DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após Coloração de *May-Grünwald-Giemsa*).

Tabela 12 – Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 3 (Fonte: IPO-Porto).

Marcadores de linhagem linfoide	CD1a- CD2- CD3- CD4- CD5- CD7+ [‡] CD8- CD10- CD19-/ + [‡] CD20- CD56- CD79a-
Marcadores mielomonocíticos	CD11b-/ + CD11c-/ + CD13- CD14- CD15-/ ++ CD16- CD33+d/ + CD36- cCD41- CD61- CD64+d/ + CD65-/ +d CD71+ CD105- CD123+ MPO-
Marcadores de <i>stem cells</i> e células progenitoras	CD34- CD117- HLA-DR+/ ++ TdT-
Outros marcadores	CD38+/ ++ CD45+ NG2-/ + [◊]

CD, *Cluster of Differentiation*; HLA-DR, *Human Leucocyte Antigen D Related*; MPO, Mieloperoxidase; NG2, *Neural Antigen 2*; TdT, *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*.

[‡] Marcadores aberrantes de linhagem;

[◊] antígeno específico da leucemia, encontrado em células leucémicas com rearranjos do *KMT2A*.

Tabela 13 – Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 3 (Fonte: IPO-Porto).

Citogenética	Cariótipo: em dezoito das vinte células analisadas foi encontrada a t(4;11)(q21;q23). FISH: em 88% das células analisadas foi encontrada uma translocação envolvendo o gene <i>KMT2A</i> .
Genética molecular	RT-PCR qualitativo: foi detetada a presença do RNA de fusão <i>KMT2A-AFF1</i> . Sequenciação Automática: não foi detetada a mutação <i>FLT3-ITD</i> .

FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*; RNA, *Ribonucleotide Acid*; RT-PCR, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*;

Atendendo à combinação da informação das diferentes áreas de estudo, foi diagnosticada LMA com t(4;11)(q21;q23); *KMT2A-AFF1*, que está associada a mau prognóstico.

Caso 4

Criança de 2 anos, sexo masculino, transferida de um Hospital da Região Norte para o IPO-Porto, por suspeita de leucemia.

Sintomatologia: episódios frequentes de febre e obstrução nasal, compatível com uma infeção viral, que foi tratada. Equimoses fáceis, epistaxis e gengivorragia frequentes, palidez e recusa alimentar parcial. Dor abdominal e vômitos esporádicos, sem diarreia.

Uma vez no IPO, foi realizado um hemograma, acompanhado do estudo morfológico do esfregaço de sangue periférico. Foram também realizados estudos imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares.

O hemograma, representado na Figura 21, revelou anemia normocrômica normocítica, ligeira anisocitose, trombocitopenia e presença de plaquetas gigantes. No gráfico de dispersão detetou-se uma população celular de intensa fluorescência, compatível com células blásticas, em concordância com a população representada na contagem diferencial leucocitária.

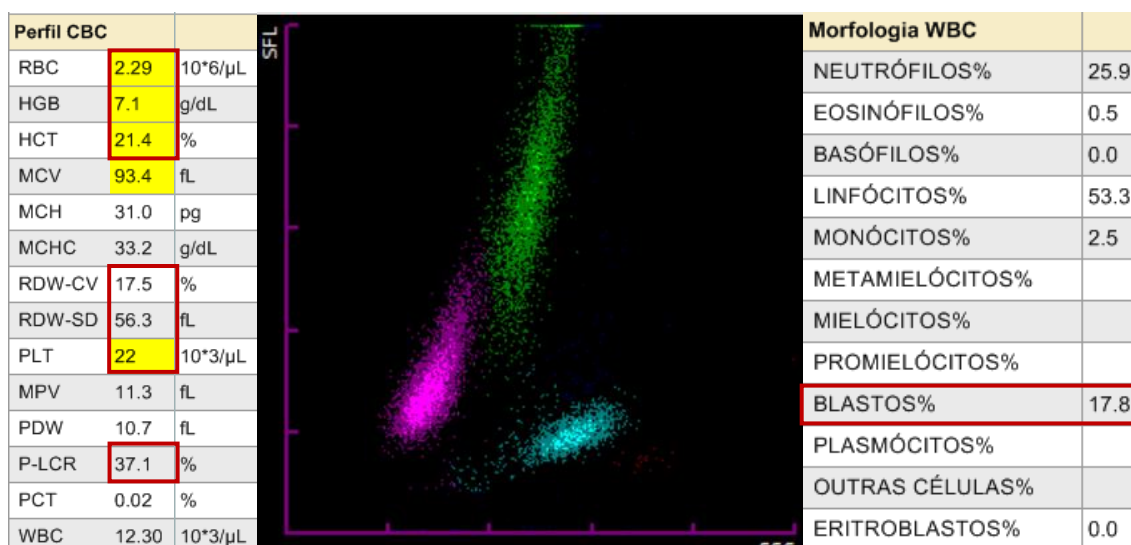


Figura 21 – Hemograma do doente – caso 4 (Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000).

O estudo morfológico do esfregaço sanguíneo confirmou a presença de células blásticas, de tamanho pequeno/médio, citoplasma bastante basófilo, elevada razão núcleo:citoplasma, evidenciando por vezes nucléolos (Figura 22).

O estudo imunofenotípico (Tabela 14) revelou, por um lado, expressão de marcadores mieloides como o CD13, o CD33, e, por outro, ausência de outros como a MPO. As células não expressam marcadores de linhagem linfóide, à exceção do marcador aberrante CD7, associado a mau prognóstico.

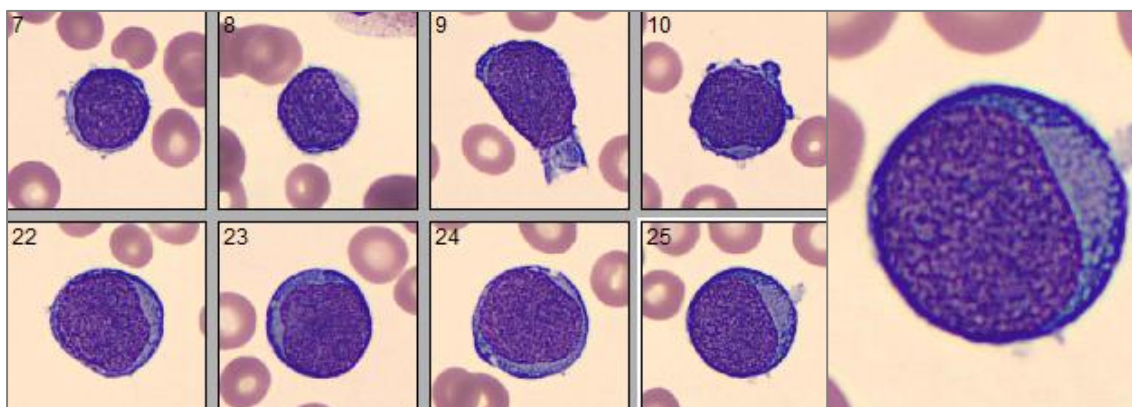


Figura 22 – Morfologia das células blásticas presentes no esfregaço sanguíneo do doente – caso 4 (imagens obtidas pelo *CellaVision®* DM96 do Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após Coloração de *May-Grünwald-Giemsa*).

Tabela 14 – Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 4 (fonte: IPO-Porto).

Marcadores de linhagem linfoide	CD2- CD3- CD4- CD5- CD7+* CD8- CD10- CD19- CD20- CD56-
Marcadores mielomonocíticos	CD11b- CD13+ heterogéneo CD14- CD15- CD16- CD33+ homogéneo CD36-/+ CD64- CD65- CD123- MPO-
Marcadores de <i>stem cells</i> e células progenitoras	CD34-/+ CD117+ HLA-DR- TdT-
Outros marcadores	CD38-/+ NG2-

CD, *Cluster of Differentiation*; HLA-DR, *Human Leucocyte Antigen D Related*; NG2, *Neural Antigen 2*; TdT, *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*.

* Marcadores aberrantes de linhagem;

As características morfológicas das células observadas no esfregaço sanguíneo, em conjunto com a ausência de expressão de Mieloperoxidase (MPO), são compatíveis com uma LMA-M0, segundo a Classificação FAB.

Os resultados do estudo citogenético e molecular encontra-se na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 4 (Fonte: IPO-Porto).

Citogenética	FISH: em 21% das células analisadas foi detetada uma deleção da banda cromossómica 7q36.
Genética molecular	RT-PCR qualitativo: não foram detetados os genes de fusão mais frequentes. Sequenciação Automática: não foi detetada a mutação <i>FLT3</i> -ITD.

FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*; RT-PCR, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*;

Atendendo à combinação da informação das diferentes áreas de estudo, foi diagnosticada LMA com deleção da banda cromossómica 7q. O prognóstico desta deleção é incerto, dependendo de outras alterações cromossómicas adicionais.

Caso 5

Adolescente de 13 anos, sexo masculino, transferido de um Hospital da Região Norte para o IPO-Porto, por suspeita de leucemia.

Sintomatologia: febre, hemorragias gengivais e aparecimento fácil de hematomas. Após queda fez traumatismo na região inguinal e os hematomas e petéquias agravaram-se por todo o corpo, principalmente nas costas e membros. Sem adenopatias palpáveis.

Uma vez no IPO, foi realizado um hemograma, acompanhado do estudo morfológico do esfregaço de sangue periférico. Foram também realizados estudos imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares.

O hemograma, representado na Figura 23, revelou pancitopenia com anemia normocrômica normocítica, ligeira anisocitose e presença de plaquetas gigantes. No gráfico de dispersão detetou-se uma população celular de fluorescência moderada/intensa, compatível com células imaturas. A contagem diferencial leucocitária revelou a presença de células blásticas e outros precursores mieloides, com predomínio de promielócitos, e ainda a presença de eritroblastos.

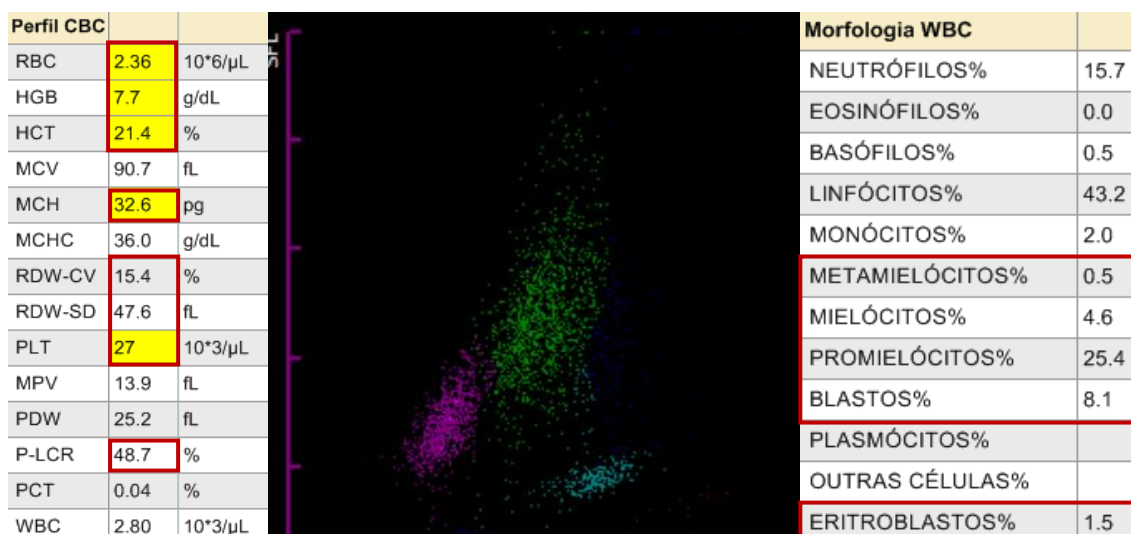


Figura 23 – Hemograma do doente – caso 5 (Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000).

O estudo morfológico do esfregaço sanguíneo confirmou a presença de grandes promielócitos, com granulação azurófila citoplasmática abundante, evidenciando Corpos de Auer e nucléolos, compatível com uma LMA-M3, pela Classificação FAB (Figura 24).

O estudo imunofenotípico (Tabela 16) revelou expressão de marcadores mieloides como o CD13 e o CD33 e a ausência de expressão de HLA-DR, um achado comum neste tipo de LMA. Revelou ainda ausência de expressão de marcadores de linhagem linfóide.

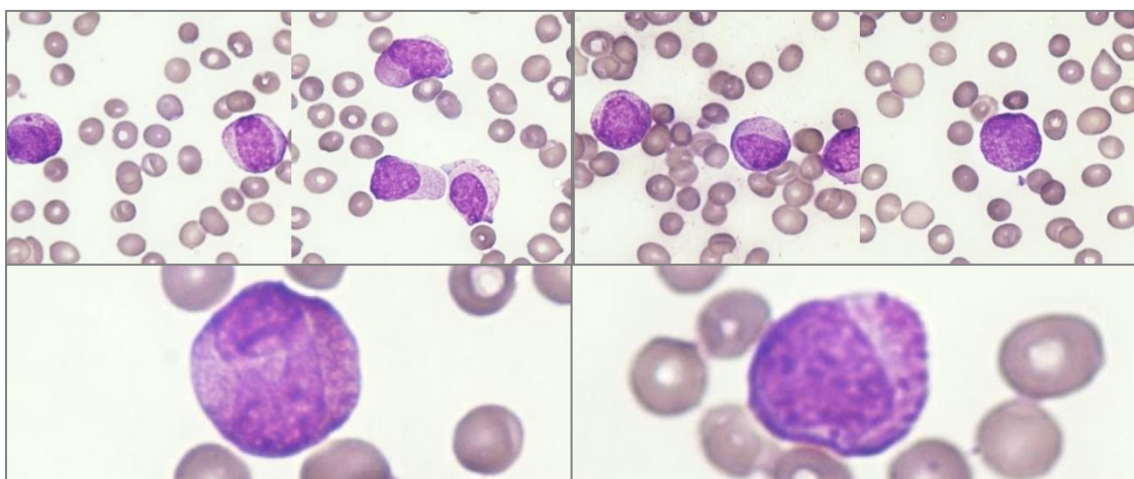


Figura 24 – Morfologia dos promielócitos presentes no esfregaço sanguíneo do doente – caso 5 (imagens obtidas por Microscopia Ótica, ampliação de 1000x, no Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO-Porto, após Coloração de *May-Grünwald-Giemsa*).

Tabela 16 – Perfil imunofenotípico das células leucémicas do doente – caso 5 (Fonte: IPO-Porto).

Marcadores de linhagem linfoide	CD2- CD3- CD7- CD10- CD19- CD20- CD56- cCD79a-
Marcadores mielomonocíticos	CD11b- CD13+heterogéneo CD14- CD15-/+débil CD16- CD33++homogéneo CD36- CD64+ MPO+/++
Marcadores de <i>stem cells</i> e células progenitoras	CD34-/+ CD117+ HLA-DR- TdT-
Outros marcadores	CD38-/+ CD45+ CD203c- NG2-

CD, *Cluster of Differentiation*; HLA-DR, *Human Leucocyte Antigen D Related*; MPO, *Mieloperoxidase*; NG2, *Neural Antigen 2*; TdT, *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*.

Os resultados do estudo citogenético e molecular encontra-se na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados dos estudos citogenéticos e moleculares – caso 5 (Fonte: IPO-Porto).

Citogenética	Cariótipo: dezasseis das vinte metáfases analisadas evidenciou uma t(15;17). FISH: em 89% das células analisadas foi detetada a fusão <i>PML-RARA</i> .
Genética molecular	RT-PCR qualitativo: presença do RNA de fusão <i>PML-RARA</i> , do tipo bcr1; não foram detetados outros rearranjos correspondentes aos genes de fusão mais frequentes. Sequenciação Automática: não foi detetada a mutação <i>FLT3-ITD</i> .

BCR1, *Breakpoint Cluster Region 1*; FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*; RNA, *Ribonucleotide Acid*; RT-PCR, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*;

Atendendo à combinação da informação das diferentes áreas de estudo, foi diagnosticada LMA com t(15;17)(q22;q21); *PML-RARA*, que está associada a muito bom prognóstico devido ao sucesso da terapêutica com ATRA.

8 Conclusão

A LMA é uma doença rara na criança cujo desfecho depende da abordagem e diagnóstico inicial. O diagnóstico laboratorial baseia-se na combinação da morfologia, citoquímica, imunofenotipagem, citogenética e genética molecular.

O tratamento da LMA envolve um tratamento de primeira linha, recorrendo a quatro/cinco ciclos de quimioterapia, geralmente envolvendo Antraciclinas e Citarabina, e a um tratamento de consolidação que pode passar pela continuação da quimioterapia ou pela TCPH. Nos doentes considerados de baixo risco a quimioterapia é suficiente. A utilização da TCPH nas crianças com LMA é controversa, sendo mais indicado nos doentes em recidiva e em alguns casos de doentes considerados de alto risco, em remissão completa.

A melhor compreensão das alterações genéticas responsáveis pelo desenvolvimento de LMA permite alocar os doentes a determinados grupos de risco e, assim, adequar a abordagem terapêutica. A avaliação da resposta ao tratamento por deteção da DRM é também importante para monitorizar a progressão da doença e eventual ajuste da terapêutica.

No futuro, os diferentes grupos de estudo, deverão distribuir os seus esforços, por um lado, pela melhor compreensão da biologia da doença, abrindo portas para o estudo do prognóstico das diferentes alterações e, deste modo, para adaptação da terapêutica. Por outro lado, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos igualmente eficazes, mas menos tóxicos, como os agentes moleculares, é uma área em crescimento.

Referências bibliográficas

1. Bain BJ. Blood Cells: A Practical Guide. 4th ed. Blackwell; 2014. 488 p.
2. European Environment and Health Information System. Incidence of Childhood Leukaemia. Vol. 2000. 2009.
3. Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCare-5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):35–47.
4. Doll R, Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol*. 1997;70:130–9.
5. Bruwier A, Chantrain CF. Hematological disorders and leukemia in children with Down syndrome. *Eur J Pediatr*. 2012;171(9):1301–7.
6. Seif AE. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer Genet*. 2011;204(5):227–44.
7. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact*. 2012;196(3):59–67.
8. Crump C, Sundquist J, Sieh W, Winkleby MA, Sundquist K. Perinatal risk factors for acute myeloid leukemia. *Eur J Epidemiol*. 2015;30(12):1277–85.
9. Johnson KJ, Carozza SE, Chow EJ, Fox EE, Horel S, McLaughlin CC, et al. Parental age and risk of childhood cancer: a pooled analysis. *Epidemiology*. 2009;20(4):475–83.
10. Latino-Martel P, Chan DSM, Druesne-Pecollo N, Barrandon E, Hercberg S, Norat T. Maternal alcohol consumption during pregnancy and risk of childhood leukemia: systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(5):1238–60.
11. Metayer C, Petridou E, Aranguré JMM, Roman E, Schüz J, Magnani C, et al. Parental tobacco smoking and acute myeloid leukemia. *Am J Epidemiol*. 2016;184(4):261–73.
12. Pyatt D, Hays S. A review of the potential association between childhood leukemia and benzene. *Chem Biol Interact*. 2010;184(1-2):151–64.
13. Caughey RW, Michels KB. Birth weight and childhood leukemia: a meta-analysis and review of the current evidence. *Int J Cancer*. 2009;124(11):2658–70.
14. Spector LG, Xie Y, Robison LL, Heerema NA, Hilden JM, Lange B, et al. Maternal diet and infant leukemia: The DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(3):651–5.
15. Alcalay M, Orleth A, Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, et al.

- Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2001;20(40):5680–94.
16. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):551–65.
 17. Harrison CJ, Hills RK, Moorman A V., Grimwade DJ, Hann I, Webb DKH, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2674–81.
 18. Swerdlow et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. edition). 4^a ed. International Agency for Research on Cancer, editor. Lyon, France; 2008. 439 p.
 19. Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G, et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood*. 2007;110(3):979–85.
 20. Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, et al. Prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer J*. 2014;4:e226.
 21. Ho PA, Zeng R, Alonzo TA, Gerbing RB, Miller KL, Pollard JA, et al. Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): A report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2010;116(5):702–10.
 22. Hollink IHIM, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Zimmermann M, Balgobind B V., Arentsen-Peters STCJM, Alders M, et al. Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(23):5951–60.
 23. Qin YZ, Zhu HH, Jiang Q, Jiang H, Zhang LP, Xu LP, et al. Prevalence and prognostic significance of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia: a comprehensive large-scale study from a single chinese center. *Leuk Res*. 2014;38(12):1435–40.
 24. Berman JN, Gerbing RB, Alonzo T a, Ho P a, Miller K, Hurwitz C, et al. Prevalence and clinical implications of NRAS mutations in childhood AML: a report from the Children's Oncology Group. *Leukemia*. 2011;25:1039–42.
 25. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451–8.
 26. Van den Berghe H. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Second MIC Cooperative Study Group. *Br J Haematol*. 1988;68(4):487–94.

27. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol.* 1991;78(3):325–9.
28. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–405.
29. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer.* 2009;100(8):1343–6.
30. Bacher U, Schnittger S, Maciejewski K, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, et al. Multilineage dysplasia does not influence prognosis in CEBPA-mutated AML, supporting the WHO proposal to classify these patients as a unique entity. *Blood.* 2012;119(20):4719–22.
31. Falini B, Maciejewski K, Weiss T, Bacher U, Schnittger S, Kern W, et al. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). *Blood.* 2010;115(18):3776–86.
32. Creutzig U, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, De Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2012;120(16):3167–205.
33. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453–74.
34. Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol.* 2008;9(3):257–68.
35. Palmer L, Briggs C, Mcfadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(3):287–303.
36. Hoffbrand V, Moss P, Pettit J. Acute Leukemias. In: *Essential Haematology*. 6th ed. 2011. p. 388.
37. Smith AR, Christiansen EC, Wagner JE, Cao Q, Macmillan ML, Stefanski HE, et al. Early hematopoietic stem cell transplant is associated with favorable outcomes in children with MDS. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(4):705–10.
38. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia.* 2003;17(2):277–82.

39. Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematologica*. 2009;94(8):1135–50.
40. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011;25(4):567–74.
41. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10):1783–6.
42. Lacombe F, Durrieu F, Briaïs A, Dumain P, Belloc F, Bascans E, et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1997;11(11):1878–86.
43. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytom B Clin Cytom*. 2007;72(1):S14–22.
44. Balgobind B V., Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. 2009;114(12):2489–96.
45. Ho PA, Alonzo TA, Gerbing RB, Pollard J, Stirewalt DL, Hurwitz C, et al. Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children’s Oncology Group. *Blood*. 2009;113(26):6558–66.
46. Hollink IHIM, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters TCJM, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia*. 2009;23(2009):262–70.
47. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, et al. Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97(1):89–94.
48. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park M-J, Jo A, Mitani S, et al. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(7):683–93.

49. Von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, Zimmermann M, Bradtke J, Betts DR, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2682–9.
50. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3654–61.
51. De Bruin AM, Voermans C, Nolte MA. Impact of interferon-g on hematopoiesis. *Blood*. 2014;124(16):2479–86.
52. Jo A, Mitani S, Shiba N, Hayashi Y, Hara Y, Takahashi H, et al. High expression of EVI1 and MEL1 is a compelling poor prognostic marker of pediatric AML. *Leukemia*. 2015;29(5):1076–83.
53. de Jonge HJM, Valk PJM, de Bont ESJM, Schuringa JJ, Ossenkoppele G, Vellenga E, et al. Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. *Haematologica*. 2011;96(9):1311–7.
54. Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, Pounds SB, Shurtleff SA, Wang KY, et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30(29):3625–32.
55. Tierens A, Bjørklund E, Siitonen S, Marquart HV, Wulff -Juergensen G, Pelliniemi TT, et al. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study. *Br J Haematol*. 2016;174(4):600–9.
56. van der Velden VH, van der Sluijs-Geling A, Gibson BES, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Hop WCJ, et al. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol. *Leukemia*. 2010;24(9):1599–606.
57. Abbott B, Rubnitz J, Tong X, Srivastava D, Pui C-H, Ribeiro R, et al. Clinical significance of central nervous system involvement at diagnosis of pediatric acute myeloid leukemia: a single institution's experience. *Leukemia*. 2003;17(11):2090–6.
58. Cruse JM, Lewis RE, Pierce S, Lam J, Tadros Y. Aberrant expression of CD7, CD56, and CD79a antigens in acute myeloid leukemias. *Exp Mol Pathol*. 2005;79(1):39–41.
59. Kaspers GJL, Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia*. 2005;19(2005):2025–9.
60. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Hunter AE, Kjeldsen L, Yin J, et al. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the

- medical research council AML15 trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3360–8.
61. Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Reinhardt D, Hermann J, Henze G, et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia*. 2005;19(12):2030–42.
 62. Gibson BES, Webb DKH, Howman AJ, de Graaf SSN, Harrison CJ, Wheatley K. Results of a randomized trial in children with acute myeloid leukaemia: Medical Research Council AML12 trial. *Br J Haematol*. 2011;155(3):366–76.
 63. Mandelli F, Vignetti M, Suci S, Stasi R, Petti MC, Meloni G, et al. Daunorubicin versus mitoxantrone versus idarubicin as induction and consolidation chemotherapy for adults with acute myeloid leukemia: The EORTC and GIMEMA groups study AML-10. *J Clin Oncol*. 2009;27(32):5397–403.
 64. Gamis AS, Alonzo TA, Meshinchi S, Sung L, Gerbing RB, Raimondi SC, et al. Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: results from the randomized phase III children's oncology group Trial AAML0531. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3021–32.
 65. Lipshultz SE, Cochran TR, Franco VI, Miller TL. Treatment-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(12):697–710.
 66. U.S. Food and Drug Administration. Drug safety and availability - FDA statement on dexrazoxane [Internet]. Center for Drug Evaluation and Research; 2011 [cited 2016 Jul 2]. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm263729.htm>
 67. Creutzig U, Zimmermann M, Bourquin JP, Dworzak MN, Fleischhack G, Graf N, et al. Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia: results from study AML-BFM 2004. *Blood*. 2013;122(1):37–43.
 68. Moore a S, Kearns PR, Knapper S, Pearson a DJ, Zwaan CM. Novel therapies for children with acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2013;27(7):1451–60.
 69. Tasian SK, Pollard J a, Aplenc R. Molecular therapeutic approaches for pediatric acute myeloid leukemia. *Front Oncol*. 2014;4:55.
 70. Cooper TM, Franklin J, Gerbing RB, Alonzo TA, Hurwitz C, Raimondi SC, et al. AAML03P1, a pilot study of the safety of gemtuzumab ozogamicin in combination with chemotherapy for newly diagnosed childhood acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2012;118(3):761–9.
 71. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, Gardner MF, Brigham D, Belli B, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2009;114(14):2984–92.
 72. Knapper S. The clinical development of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia.

- Expert Opin Investig Drugs. 2011;20(10):1377–95.
73. Niewerth D, Creutzig U, Bierings MB, Kaspers GJL. A review on allogeneic stem cell transplantation for newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(13):2205–14.
 74. Bitan M, He W, Zhang M-J, Abdel-Azim H, Ayas MF, Bielora B, et al. Transplantation for children with acute myeloid leukemia: a comparison of outcomes with reduced intensity and myeloablative regimens. *Blood*. 2014;123(10):1615–20.
 75. Meshinchi S. Hematopoietic cell transplantation in high-risk childhood acute myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(7):1002–3.
 76. Bally C, Fadlallah J, Leverger G, Bertrand Y, Robert A, Baruchel A, et al. Outcome of acute promyelocytic leukemia (APL) in children and adolescents: an analysis in two consecutive trials of the European APL Group. *J Clin Oncol*. 2012;30(14):1641–6.
 77. Horan JT, Alonzo TA, Lyman GH, Gerbing RB, Lange BJ, Ravindranath Y, et al. Impact of disease risk on efficacy of matched related bone marrow transplantation for pediatric acute myeloid leukemia: the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5797–801.
 78. Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tabuchi K, Kigasawa H, Tsuchida M, et al. Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute myeloid leukemia: the AML99 trial from the Japanese childhood AML cooperative study group. *J Clin Oncol*. 2009;27(24):4007–13.
 79. Gibson BES, Wheatley K, Hann IM, Stevens RF, Webb D, Hills RK, et al. Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia*. 2005;19(12):2130–8.
 80. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(6):543–52.
 81. Kaspers G. How I treat paediatric relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2014;166(5):636–45.
 82. Inaba H, Fan Y, Pounds S, Geiger TL, Rubnitz JE, Ribeiro RC, et al. Clinical and biologic features and treatment outcome of children with newly diagnosed acute myeloid leukemia and hyperleukocytosis. *Cancer*. 2008;113(3):522–9.
 83. Dinnel J, Moore BL, Skiver BM, Bose P. Rasburicase in the management of tumor lysis: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evid*. 2015;10:23–38.
 84. Oberoi S, Lehrnbecher T, Phillips B, Hitzler J, Ethier MC, Beyene J, et al. Leukapheresis and low-dose chemotherapy do not reduce early mortality in acute myeloid leukemia hyperleukocytosis: a systematic review and meta-analysis. *Leuk*

- Res. 2014;38(4):460–8.
85. Groll AH, Castagnola E, Cesaro S, Dalle JH, Engelhard D, Hope W, et al. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation. *Lancet Oncol.* 2014;15(8):e327–40.
 86. Sung L, Aplenc R, Alonzo TA, Gerbing RB, Lehrnbecher T, Gamis AS. Effectiveness of supportive care measures to reduce infections in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. *Blood.* 2013;121(18):3573–7.
 87. Van Dongen-Melman JE, De Groot A, Van Dongen JJ, Verhulst FC, Hähnen K. Cranial irradiation is the major cause of learning problems in children treated for leukemia and lymphoma: a comparative study. *Leukemia.* 1997;11(8):1197–200.
 88. Kaspers GJL, Zimmermann M, Reinhardt D, Gibson BES, Tamminga RYJ, Aleinikova O, et al. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the international BFM study group. *J Clin Oncol.* 2013;31(5):599–607.
 89. Rubnitz JE, Inaba H. Childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2012;159(3):259–76.
 90. Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak MN, Gibson B, Tamminga R, Abrahamsson J, et al. The prognostic significance of early treatment response in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of the international study relapsed AML 2001/01. *Haematologica.* 2014;99(9):1472–8.
 91. Creutzig U, Zimmermann M, Bourquin J-P, Dworzak MN, Kremens B, Lehrnbecher T, et al. Favorable outcome in infants with AML after intensive first- and second-line treatment: an AML-BFM study group report. *Leukemia.* 2012;26(4):654–61.
 92. Balgobind B V., Hollink IHIM, Arentsen-Peters STCJM, Zimmermann M, Harbott J, Berna Beverloo H, et al. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2011;96(10):1478–87.
 93. Slater RM, von Drunen E, Kroes WG, Weghuis DO, van den Berg E, Smit EM, et al. t(7;12)(q36;p13) and t(7;12)(q32;p13)-translocations involving ETV6 in children 18 months of age or younger with myeloid disorders. *Leukemia.* 2001;15(6):915–20.
 94. Masetti R, Rondelli R, Fagioli F, Mastronuzzi A, Pierani P, Togni M, et al. Infants with acute myeloid leukemia treated according to the Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica 2002/01 protocol have an outcome comparable to that of older children. *Haematologica.* 2014;99(8):e127–9.
 95. Pui CH, Raimondi SC, Srivastava DK, Tong X, Behm FG, Razzouk B, et al.

- Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2000;14(4):684–7.
96. Koren G, Schechter T. Cancer chemotherapy in young children: challenges and solutions. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49(7):1091–2.
 97. Masetti R, Vendemini F, Zama D, Biagi C, Pession A, Locatelli F. Acute myeloid leukemia in infants: biology and treatment. *Front Pediatr*. 2015;3:37.
 98. Seewald L, Taub JW, Maloney KW, McCabe ERB. Acute leukemias in children with Down syndrome. *Mol Genet Metab*. 2012;107(1-2):25–30.
 99. Zipursky A, Brown E, Christensen H, Sutherland R, Doyle J. Leukemia and/or myeloproliferative syndrome in neonates with Down syndrome. *Semin Perinatol*. 1997;21(1):97–101.
 100. Massey G V., Zipursky A, Chang MN, Doyle JJ, Nasim S, Taub JW, et al. A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down Syndrome (DS): Children’s Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood*. 2006;107(12):4606–13.
 101. Dixon N, Kishnani PS, Zimmerman S. Clinical manifestations of hematologic and oncologic disorders in patients with Down syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2006;142(3):149–57.
 102. Bull MJ. Health Supervision for Children With Down Syndrome. *Pediatrics*. 2011;128(2):393–406.
 103. Langebrake C, Creutzig U, Reinhardt D. Immunophenotype of Down Syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts. *Klin Padiatr*. 2005;217(3):126–34.
 104. Cabelof DC, Patel H V., Chen Q, Van Remmen H, Matherly LH, Ge Y, et al. Mutational spectrum at GATA1 provides insights into mutagenesis and leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*. 2009;114(13):2753–63.
 105. Magalhães IQ, Splendore A, Emerenciano M, Figueiredo A, Ferrari Í, Pombo-de-Oliveira MS. GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;166(2):112–6.
 106. Pine SR, Guo Q, Yin C, Jayabose S, Levendoglu-Tugal O, Ozkaynak MF, et al. GATA1 as a new target to detect minimal residual disease in both transient leukemia and megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Leuk Res*. 2005;29(11):1353–6.
 107. Sorrell AD, Alonzo TA, Hilden JM, Gerbing RB, Loew TW, Hathaway L, et al. Favorable survival maintained in children who have myeloid leukemia associated with Down syndrome using reduced-dose chemotherapy on Children’s Oncology Group trial A2971: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer*.

- 2012;118(19):4806–14.
108. Klusmann JH, Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak M, Jorch N, Langebrake C, et al. Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. *Blood*. 2008;111(6):2991–8.
 109. Zhang L, Samad A, Pombo-de-Oliveira MS, Scelo G, Smith MT, Feusner J, et al. Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. *Blood Rev*. 2015;29(2):101–25.
 110. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1875–91.
 111. Zhou J, Zhang Y, Li J, Li X, Hou J, Zhao Y, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of children with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(9):1697–702.
 112. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(2):111–21.
 113. Sanz MA, Montesinos P. How we prevent and treat differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(18):2777–82.
 114. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26:1908–75.



Ana Teresa Coutinho Ribeiro Pereira

Relatório de Estágio Profissional

Relatório de Estágio Profissional do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de
Mestre em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade do
Porto

Trabalho realizado no Instituto Português de Oncologia do Porto, sob a orientação
da Doutora Albina Marinho

Setembro de 2016

Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem a orientação da Dra. Albina Marinho, que não só me ajudou ao longo dos quatro meses que passei no IPO, como se manteve um grande apoio durante o desenvolvimento da Monografia.

O meu segundo agradecimento vai para a equipa do Departamento de Diagnóstico Laboratorial do IPO-Porto, desde os Assistentes Operacionais aos Médicos, passando pelos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica e pelos Técnicos Superiores de Saúde, que me acolheu de braços abertos e possibilitou a minha aprendizagem ao longo desta etapa.

Um especial agradecimento vai também para o grupo de internos com o qual tive o prazer de trabalhar e partilhar experiências (Carolina, Catarina, Ricardo, David, Paulo e Gisela).

À Catarina Fonseca e à Carla Azevedo, colegas e amigas que levo para a vida, agradeço pela paciência, boa disposição, apoio e conversas infundáveis.

Esta será, sem dúvida, uma experiência que não irei esquecer. Muitos são os valores que levo, de um lugar onde se trabalha com carinho, alegria e boa disposição.

Conteúdo

Agradecimentos	ii
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas	vii
Abreviaturas	viii
1. Introdução	1
1.1. O IPO-Porto.....	2
1.2. Departamento de Diagnóstico Laboratorial.....	2
2. Fase Pré-Analítica.....	3
2.1. Colheita das amostras	3
2.2. Transporte das amostras.....	4
2.3. Receção das amostras	4
2.4. Água reagente no Laboratório Clínico	5
3. Hematologia Laboratorial.....	6
3.1. Área de receção e processamento das amostras	6
3.1.1. Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000	6
3.1.2. VES Matic 30.....	11
3.1.3. Aerospray® Slidestainer Cytocentrifuge	11
3.1.4. CellaVision® DM96	11
3.1.5. Colorações citoquímicas.....	12
3.2. Área de validação dos resultados	12
4. Imunologia Celular	13
4.1. Citometria de Fluxo	13
4.2. Área de receção e processamento de amostras.....	14
4.3. Área de Marcação	14
4.4. Área de Aquisição	15
4.5. Setor de Análise	15
5. Química Clínica.....	16
5.1. Laboratório Geral 1.....	16

5.1.1.	Olympus OLA2500™	17
5.1.2.	Autoanalisador AU5800.....	17
5.1.3.	Autoanalisador Cobas® e 601	18
5.1.4.	Autoanalisador Cobas® e 411	19
5.1.5.	Immulite® 2000	20
5.1.6.	GEM Premier 3000.....	20
5.1.7.	Vapro®.....	21
5.1.8.	Adams A1C HA8160	21
5.2.	Laboratório Geral 2.....	21
5.2.1.	Setor de Urinas, Fezes e Líquidos Biológicos.....	21
5.2.2.	Setor de Farmacologia	26
5.3.	Setor de RIA.....	27
5.4.	Laboratório de HPLC	27
6.	Virologia.....	28
6.1.	Laboratório de Virologia Geral	28
6.1.1.	Antigenemia de CMV.....	29
6.1.2.	Deteção de vírus respiratórios	30
6.1.3.	Serodiagnóstico Vírico.....	31
6.1.4.	Deteção de Rotavírus e Adenovírus em fezes	32
6.1.5.	Deteção de Anticorpos Heterófilos de EBV	32
6.2.	Laboratório de Biologia Molecular.....	33
6.2.1.	Extração de ácidos nucleicos.....	34
6.2.2.	Genotipagem de HPV.....	34
6.2.3.	Quantificação absoluta da carga viral de ADV, CMV, EBV, BKV e HHV-6.....	34
6.2.4.	Deteção de IA, IB, RSV, variante A/H1N1, HSV-1 e HSV-2	35
7.	Microbiologia	36
7.1.	Setor de recepção, processamento e sementeira das amostras.....	36
7.1.1.	Coloração de Gram e Ziehl-Neelsen.....	38
7.1.2.	Incubação.....	38

7.1.3. Detecção de antígenos por Ensaio Imunocromatográfico	39
7.1.4. Exame parasitológico de fezes	39
7.1.5. Hemoculturas	39
7.2. Setor de Leituras, Provas acessórias, Identificação e Testes de suscetibilidade	40
7.2.1. Observação microscópica de lâminas	40
7.2.2. Leituras	40
7.2.3. Detecção e identificação de <i>Legionella pneumophila</i>	42
7.2.4. Detecção de <i>P. jirovecii</i>	42
7.2.5. Provas auxiliares de diagnóstico	43
7.2.6. Identificações e Testes de Suscetibilidade	46
7.2.7. Estudo das resistências a antibióticos	48
7.3. Laboratório de Micobactérias.....	48
7.3.1. Descontaminação.....	49
7.3.2. Exame cultural.....	49
7.3.3. Coloração de Auramina	50
7.3.4. Antibiograma	51
7.4. Laboratório de Serologia	51
7.4.1. Serodiagnóstico de antígenos febris	51
7.4.2. Serodiagnóstico de Toxoplasmose	51
7.4.3. Serodiagnóstico de Sífilis	52
7.5. Serviço de Microbiologia – Laboratório de Biologia Molecular	53
7.5.1. Detecção do antígeno <i>Galactomannan</i>	53
7.5.2. Detecção do locus de patogenicidade e das toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i>	53
7.5.3. Extração de ácidos nucleicos	54
7.5.4. Detecção quantitativa de RNA de micobactérias.....	54
7.5.5. Detecção quantitativa de RNA de fungos	54
8. Controlo de Qualidade	55
Referências Bibliográficas	59

Índice de Figuras

Figura 1 - Vista aérea do IPO-Porto.	2
Figura 2 - Organograma do Departamento de Diagnóstico Laboratorial.	2
Figura 3 - Fluxograma do processo de avaliação das amostras.	5
Figura 4 - Sedimentos urinários observados por Microscopia Ótica.	24
Figura 5 - Sedimentos urinários observados por Microscopia Ótica.	25
Figura 6 - Cristais de Oxalato de Cálcio Monohidratados	25
Figura 7 - Cristais de Tirosina.	25
Figura 8 - Leucócitos infetados com CMV.	30
Figura 9 - Células infetadas com vírus respiratórios (<i>screen</i>).	30
Figura 10 - Detecção de Anticorpos Heterófilos de Mononucleose Infeciosa..	32
Figura 11 - Coloração de gram.....	40
Figura 12 - Agentes frequentemente isolados em urina.	41
Figura 13 - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina e flora mista	41
Figura 14 - Agentes patogénicos isolados de secreções respiratórias.....	42
Figura 15 - Prova da Coagulase.....	44
Figura 16 - Prova de Sensibilidade à Optoquina.	44
Figura 17 - Identificação imunológica de <i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i>	45
Figura 18 - Prova da Filamentação	45
Figura 19 - Serogrupagem de Lancefield..	46
Figura 20 - Meio de LJ, com crescimento de micobactérias.	49
Figura 21 - Meio de MGIT sem e com crescimento microbiano.....	50
Figura 22 - Bacilos de fluorescência verde em lâmina corada pela Auramina.	50
Figura 23 - Teste Treponémico TPHA.	52

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Cronograma do estágio realizado no IPO-Porto.	1
Tabela 2 – Parâmetros determinados e calculados no <i>Sysmex</i> ®.	8
Tabela 3 - Parâmetros determinados na análise de líquidos biológicos.....	11
Tabela 4 - Parâmetros determinados no Autoanalisador AU5800	18
Tabela 5 - Parâmetros determinados no <i>Cobas</i> ® e 601.....	19
Tabela 6 - Parâmetros determinados no <i>Cobas</i> ® e 401.....	19
Tabela 7 - Parâmetros determinados no <i>Immulin</i> 2000.	20
Tabela 8 - Parâmetros bioquímicos determinados na Análise Sumária da Urina.....	23
Tabela 9 - Parâmetros determinados pelo <i>Sysmex</i> ® UF-500i.	23
Tabela 10 - Lista de fármacos doseados pelo Setor de Farmacologia	26
Tabela 11 - Lista de vírus estudados e metodologias utilizadas.	28
Tabela 12 - Lista de testes moleculares realizados no Serviço de Virologia.....	33
Tabela 13 - Meios de cultura.	37
Tabela 14 - Suspensões a utilizar no <i>Vitek 2</i> TM	47
Tabela 15 - Lista de testes moleculares realizados no Serviço de Microbiologia.....	53
Tabela 17 - Estirpes comerciais dos equipamentos de identificação automática.....	58

Abreviaturas

ADV – <i>Adenovirus</i>	IPO-EPE – Instituto Português de Oncologia, Entidade Pública Empresarial
AEQ – Avaliação Externa da Qualidade	ISO – <i>International Organization for Standardization</i>
β-hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana	JCV – <i>John Cunningham Virus</i>
BKV – <i>BK Virus</i>	LAB – Lavado Brônquico
CLSI – <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	LBA – Lavado Broncoalveolar
CMI – Concentração Mínima Inibitória	LCR – Líquido Cefalorraquidiano
CMV – <i>Citomegalovirus</i>	LJ – Meio <i>Löwenstein-Jensen</i>
CQI – Controlo de Qualidade Interno	MAC – Agár <i>MacConkey</i>
EA – <i>Early Antigen</i>	MAS – Manitol Agár Salgado
EBV – <i>Epstein Barr Virus</i>	MGIT – Meio <i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético	NA – <i>Nuclear Antigen</i>
ELFA - <i>Enzyme-linked Fluorescent Assay</i>	NRBC – Eritroblastos
ELISA – <i>Enzyme-linked Imunossorbent Assay</i>	pb – Pares de bases nucleotídicas
EUCAST – <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>	PB19 – Parvovírus B19
FAM – Fluoresceína	PBS – <i>Phosphate-buffered Saline</i>
GS – Gelose Sangue	PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>
GC – Gelose Chocolate	PCR-RFLP – <i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
GN – Caldo de enriquecimento para Gram-negativas	PLT-I – Contagem de Plaquetas por Impedância
HAV – <i>Hepatitis A Virus</i>	PLT-F – Contagem de Plaquetas por Fluorescência
HHV-6 – <i>Human Herpesvirus 6</i>	RSV – Vírus Respiratório Sincicial
HPLC – <i>High Performance Liquid Chromatography</i>	SB – Secreções Brônquicas
HPV – <i>Human Papillomavirus</i>	SCC – <i>Squamous Cell Carcinoma</i>
HSV – Herpes Simplex Virus	SLS – <i>Sodium Lauryl Sulfate</i>
IA – <i>Influenza A Virus</i>	SM2 – Meio Cromogénico de <i>Salmonella</i> spp.
IB – <i>Influenza B Virus</i>	SS – Meio de <i>Salmonella-Shigella</i>
IgA – Imunoglobulina A	VCA – <i>Viral Capsid Antigen</i>
IgG – Imunoglobulina G	VS – Velocidade de Sedimentação
IgM – Imunoglobulina M	VZV – <i>Varicella Zoster Virus</i>
IPO – Instituto Português de Oncologia	

1. Introdução

O presente relatório é referente ao estágio realizado no Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, Entidade Pública Empresarial (IPO, E.P.E.), no âmbito do Curso Mestrado em Análises Clínicas, com a duração de 450 horas (Tabela 1) e sob a orientação da Dra. Albina Marinho.

O principal objetivo do estágio passou pela integração nos vários Serviços que perfazem o Departamento de Diagnóstico Laboratorial do IPO-Porto, permitindo a consolidação do conhecimento teórico obtido durante o Mestrado e a aquisição de competências laboratoriais, possibilitando a execução das diversas metodologias, bem como a correta interpretação dos resultados.

Tabela 1 - Cronograma do estágio realizado no IPO-Porto.

Período	Valência	Total horas
04-01-16 a 15-01-16	Hematologia Laboratorial	60
18-01-16 a 29-01-16	Imunologia Celular	60
01-02-16 a 19-02-16	Química Clínica	84
22-02-16 a 11-03-16	Virologia	90
14-03-16 a 19-04-16	Microbiologia	162

Este relatório pretende descrever resumidamente o fluxo de trabalho dos Laboratórios onde foi realizado o estágio. A primeira secção é dedicada à Fase Pré-Analítica. Seguidamente, aborda-se cada uma das valências onde se realizou o estágio e principais metodologias. No final, são ainda referidos os procedimentos de Controlo de Qualidade adotados.

1.1. O IPO-Porto

O IPO-Porto (Figura 1), fundado em abril de 1974, tem como missão a prestação de cuidados de saúde ao doente oncológico, no sentido de minimizar os tempos de tratamento e maximizar as taxas de cura, melhorando a sua qualidade de vida. A prevenção, a investigação, a formação e o ensino no domínio da Oncologia, fazem também parte desta missão, assegurando qualidade, humanismo e eficiência. É uma entidade de cuidados de saúde acreditada *pela Caspe Healthcare Knowledge Systems* e como *Comprehensive Cancer Centre* pelo Centro Abrangente de Oncologia e certificada pela norma *International Organization for Standardization (ISO) 9001/2008*.



Figura 1 - Vista aérea do IPO-Porto (Fonte: www.ipoport.pt).

1.2. Departamento de Diagnóstico Laboratorial

O Departamento de Diagnóstico Laboratorial está sob a direção da Dra. Maria Augusta Guimarães e sob a responsabilidade de cada um dos diretores dos diferentes Serviços (Figura 2), localizados no quarto, quinto e sexto piso do edifício das Análises.

Departamento de Diagnóstico Laboratorial

Dra. Maria Augusta Guimarães

Anatomia Patológica	Genética	Hematologia Laboratorial	Imunologia	Microbiologia	Química Clínica	Virologia
Prof. Rui Henrique	Prof. Dr. Manuel Teixeira	Dr. Luís Araújo	Dra. Maria Augusta Guimarães	Dra. Maria Augusta Guimarães	Dr. Luís Araújo	Dra. Inês Baldaque

Figura 2 - Organigrama do Departamento de Diagnóstico Laboratorial.

2. Fase Pré-Analítica

Nos últimos anos, a Fase Pré-Analítica tem vindo a ser considerada a principal fonte de erros laboratoriais.

A Fase Pré-Analítica envolve várias etapas, desde a elaboração da requisição médica até à determinação laboratorial propriamente dita. Passa pela correta identificação do doente, correto preenchimento da requisição da análise, seleção do tipo de produto biológico mais adequado, procedimento de colheita, transporte da amostra nas condições recomendadas (temperatura, luminosidade, entre outros), realização da análise nos tempos adequados e pela deteção de possíveis fatores interferentes.

Por esta razão, a Fase Pré-Analítica não está corporizada num só local, distribuindo-se pelo gabinete médico, pela Central de Colheitas e por cada um dos Serviços onde são efetuadas as análises.

Entre os vários erros pré-analíticos possíveis, estão os seguintes:

- Erro na requisição médica, como informação clínica insuficiente;
- Erro na identificação do doente, como falta de identificação, identificação incorreta ou etiquetagem incorreta;
- Alteração do ratio sangue-anticoagulante;
- Falta de produto;
- Jejum inadequado;
- Amostras lipémicas, ictericas ou hemolisadas;
- Incorretas condições de transporte e/ou acondicionamento.

2.1. Colheita das amostras

A Central de Colheitas do IPO-Porto está localizada no segundo piso do edifício dos Laboratórios e recebe cerca de quinhentos doentes por dia. Durante o estágio houve oportunidade de visitá-la, bem como acompanhar a sua rotina de trabalho.

Aquando da chegada do doente à Central de Colheitas, são emitidas etiquetas atendendo à requisição médica que o acompanha. Cada etiqueta possui um código de barras, que identifica cada análise que o doente tem para efetuar.

Numa primeira fase, uma enfermeira agrupa os tubos correspondentes às determinações de cada doente com as respetivas etiquetas. Posteriormente, o doente é chamado ao Posto de Colheitas e a enfermeira que realiza a colheita confirma a sua identidade e distribui as etiquetas pelos tubos correspondentes.

O sangue é colhido por punção venosa, em primeiro lugar, para os tubos sem anticoagulante, ou seja, para os tubos de Bioquímica e Endocrinologia. De seguida, é

colhido sangue para os tubos com anticoagulante, como é o caso dos tubos com Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) para hemogramas. Estes tubos são de imediato invertidos, para potenciar a mistura do sangue com o anticoagulante. Nesta fase, é de extrema importância respeitar a ordem de colheita, bem como a correta homogeneização.

As colheitas pediátricas para hemogramas são efetuadas por punção digital no Serviço de Hematologia Laboratorial.

Nas colheitas de urina ocasional, urina de vinte e quatro horas e fezes, a efetuar pelo próprio doente, este deve ser instruído e totalmente esclarecido acerca de todo o processo, desde colheita, acondicionamento e transporte.

2.2. Transporte das amostras

O transporte diário das amostras é efetuado através de um sistema de vácuo que permite a comunicação dos diferentes pisos e diferentes laboratórios, assegurando a rápida e correta receção das amostras. Algumas amostras são distribuídas por assistentes operacionais.

2.3. Receção das amostras

As análises requisitadas pelo médico, associadas a uma determinada amostra, ficam guardadas na plataforma informática *e-deia Lab* e, aquando da sua receção no laboratório, através da leitura da etiqueta com o código de barras, é possível aceder a essa informação, que automaticamente comunica com os equipamentos utilizados para as determinações analíticas. É também nesta plataforma que são submetidos e validados os resultados, bem como colocadas notas consideradas pertinentes para a correta interpretação dos resultados.

Nesta fase é de extrema importância avaliar a conformidade e qualidade da amostra, sendo rejeitada se não cumprir os requisitos de aceitação, conforme a Figura 3. Alguns exemplos de amostras inadequadas são amostras de soro hemolisadas, amostras de secreções respiratórias com saliva abundante, amostras de fezes para pesquisa de *Clostridium difficile* que não sejam líquidas, amostras de sangue total para hemograma com coágulo.

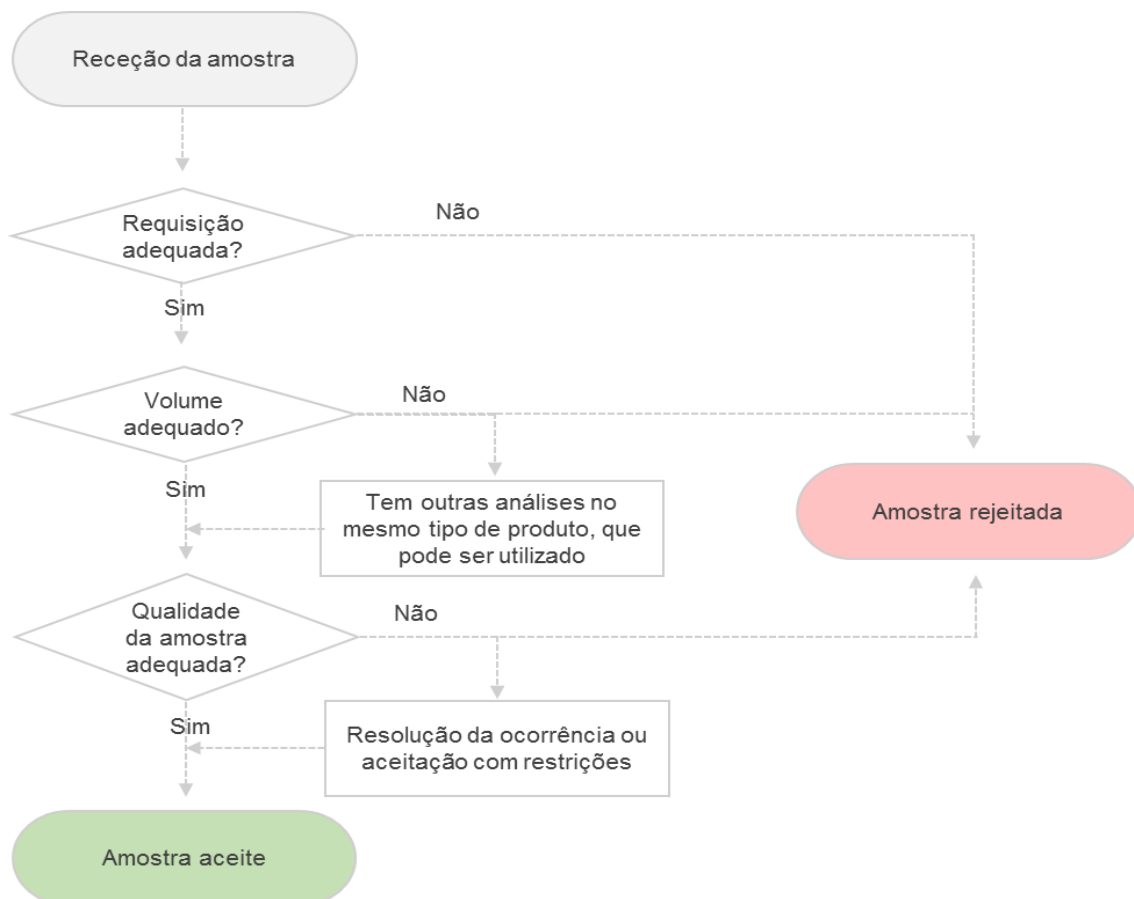


Figura 3 - Fluxograma do processo de avaliação das amostras.

2.4. Água reagente no Laboratório Clínico

A água pura é o reagente mais utilizado no Laboratório Clínico, para preparação de reagentes, tampões e diluentes, para alimentação dos equipamentos, entre outras finalidades. De modo a garantir a correta purificação e recirculação da água, o IPO-Porto possui um Sistema de Água Tipo II, o *Medica Pro*, que está localizado no quinto piso e que abastece os restantes Laboratórios, nos diferentes pisos. Este sistema é constituído por filtros e membranas, responsáveis pela remoção de iões, matéria orgânica e microrganismos. A monitorização é feita através da avaliação da Resistividade (megaohms), um indicador da contaminação iónica.

Um inadequado controlo da qualidade da água pode colocar em causa os resultados, pelo que o *Medica Pro* emite um alerta sempre que surja algum problema com algum dos constituintes. À parte destas situações esporádicas, existe uma manutenção periódica anual.

Para determinadas técnicas de Biologia Molecular e para técnicas de HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) é utilizada água com um grau de pureza superior, que normalmente é adquirida em kits comerciais.

3. Hematologia Laboratorial

No Serviço de Hematologia Laboratorial procede-se à execução e interpretação de hemogramas e mielogramas, à avaliação da Velocidade de Sedimentação (VS), à realização de colorações citoquímicas, bem como à contagem de células sanguíneas em citoesfregaços de líquidos biológicos (líquido cefalorraquidiano, pleural, ascítico, sinovial, entre outros).

O Serviço está sob a direção do Dr. Carlos Mendes e divide-se em três áreas distintas: uma sala de punções digitais, onde são colhidas amostras de sangue capilar pediátricas, uma sala de receção e processamento das amostras, onde se encontra a cadeia de autoanalisadores hematológicos, e uma terceira área destinada à validação dos resultados, onde é feita também a observação microscópica de esfregaços de sangue periférico e de medula óssea.

3.1. Área de receção e processamento das amostras

Após receção e registo das amostras na plataforma *e-deia lab*, são consultadas as requisições para decidir o destino a seguir no Laboratório.

As amostras de sangue total colhido com EDTA para hemogramas são inseridas no sistema de transporte do Autoanalisador *Sysmex®* XN-9000. Sempre que os resultados do hemograma apresentem alterações é executado e corado automaticamente um esfregaço sanguíneo. Mediante o tipo de alteração existente, o esfregaço pode ser observado manualmente, como acontece quando há alterações da Série Plaquetária, ou ser inserido no Microscópio Digital disponível no Laboratório, o *CellaVision®* DM96, que efetua o *screen* do esfregaço sanguíneo, agrupando as diferentes populações celulares.

As amostras de sangue total colhidas com Citrato de Sódio para análise da VS são processadas no equipamento *VES Matic* 30.

A contagem de líquidos biológicos (ascítico, pleural, sinovial, entre outros) é efetuada no Autoanalisador XN-9000, sendo também preparado um citoesfregaço no *Aerospray®* *Slidestainer Cytocentrifuge* e enchida uma Câmara de *Newbauer*, ambos para observação microscópica.

3.1.1. Autoanalisador Hematológico *Sysmex®* XN-9000

O Autoanalisador Hematológico *Sysmex®* XN-9000 é a cadeia de equipamentos utilizada para a realização de hemogramas no Serviço de Hematologia Laboratorial (Tabela 2).

Este Autoanalisador está equipado com dois leitores de código de barras (externo e interno), o que, por um lado, diminui os erros de identificação das amostras e, por outro,

permite a sua triagem inteligente, atendendo ao tipo de amostra ou ao tipo de requisição, orientando-as para os respectivos módulos.

Este Autoanalisador em cadeia está dividido em três setores, conectados através de um sistema de transporte (CT-90):

- Contagens hematológicas – Onde se realizam os hemogramas; constituído pelos módulos XN-10.1, XN-10.2 e XN-20, sendo que o XN-10.1 permite a contagem de líquidos biológicos e o XN-20 permite a avaliação de células mais imaturas (Reticulócitos, Precursores Plaquetários).
- Esfregaços e coloração automática – Destinado à execução de esfregaços e sua coloração automática no módulo SP-10. Este sistema garante o espalhamento uniforme do sangue, pois há um ajuste do ângulo da lâmina espalhadora e da quantidade de sangue dispensado relativamente ao valor do Hematócrito (fornecido pelo contador hematológico). Apenas são efetuados esfregaços sanguíneos das amostras com alterações no hemograma.
- Armazenamento – No módulo TS-500 as amostras são arquivadas ou separadas para a realização de outras etapas analíticas.

Este equipamento possui dois modos de funcionamento, um manual e outro automático. A maioria das amostras é colocada em *racks* no sistema de transporte e processada de modo automático, em que o próprio equipamento procede à homogeneização e aspiração das amostras. No entanto, amostras urgentes, repetições, ou amostras de medula óssea previamente diluídas, são inseridas em modo manual.

Este Autoanalisador apresenta inúmeras vantagens, entre as quais:

- Utilização de regras de validação;
- Processamento de trezentas amostras por hora;
- Separação dos tubos com erros analíticos;
- Contagem de Plaquetas por Fluorescência;
- Análise de líquidos biológicos (cefalorraquidiano, pleural, ascítico, sinovial, entre outros);
- Determinação de parâmetros de imaturidade;
- Utilização de reagentes concentrados;

O Sysmex® XN-9000 utiliza as seguintes tecnologias:

- Citometria de Fluxo com leitura por Fluorescência, para determinação da Contagem Diferencial Leucocitária, contagem de Granulócitos Imaturos (IG), de Eritroblastos (NRBC) e de Reticulócitos, da Fração Imatura dos

Reticulócitos (IRF), da Fração Imatura das Plaquetas (IPF) e das Plaquetas por Fluorescência (PLT-F).

- Focagem Hidrodinâmica e Impedância Elétrica, para determinação do Hematócrito, contagem de Eritrócitos e contagem de Plaquetas por Impedância (PLT-I);
- Método de Sulfato Lauril de Sódio, para determinação da Concentração de Hemoglobina (HGB).

Os restantes parâmetros obtidos no hemograma são parâmetros calculados tendo em conta as determinações acima referidas.

Tabela 2 – Parâmetros determinados e calculados no Sysmex®.

Citometria de Fluxo Fluorescente		
Contagem diferencial leucocitária:		HGB
Monócitos Linfócitos Eosinófilos	Basófilos Neutrófilos	PLT-F
WBC (Contagem de leucócitos)		NRBC
IG		Reticulócitos
IRF		LFR (Reticulócitos de Fluorescência Baixa)
MFR (Reticulócitos de Fluorescência Média)		HFR (Reticulócitos de Elevada Fluorescência)
Ret-He (Hemoglobina dos Reticulócitos)		IPF
Impedância		
PLT-I	RBC (Contagem de Eritrócitos)	HCT (Hematócrito)
Método de Sulfato Lauril de Sódio		
HGB		
Parâmetros calculados		
MCV (Volume Corpuscular Médio)	MCH (Hemoglobina Corpuscular Média)	MCHC (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média)
RDW-SD (Variação do tamanho dos Eritrócitos – Desvio Padrão)	RDW-CV (Variação do tamanho dos Eritrócitos – Coeficiente de Variação)	MPV (Volume Médio das Plaquetas)
PDW (Largura da distribuição calculada de Plaquetas)	PCT (Plaquetócrito)	

Cada uma das tecnologias utilizadas, bem como os diferentes canais presentes no autoanalisador, são descritos de seguida.

3.1.1.1. Impedância elétrica

A Impedância baseia-se na alteração da corrente elétrica provocada pelas células. Quando estas são forçadas a passar individualmente por um orifício, onde existe um campo elétrico, provocam uma interrupção da corrente elétrica, que é detetada e registada sob a forma de um pulso elétrico. A amplitude do pulso é proporcional ao volume celular e o número de pulsos ao número de células. A informação é tratada sob a forma de histogramas.

Esta é a tecnologia utilizada para a contagem de eritrócitos e plaquetas.

3.1.1.2. Citometria de Fluxo com leitura de fluorescência

É utilizado um reagente de lise celular específico que permite a entrada do reagente de fluorescência específico para os ácidos nucleicos das diferentes células. Sendo a Citometria uma análise multiparamétrica, através da dispersão frontal e lateral da luz vai ser possível determinar o tamanho e complexidade celulares, além da emissão de fluorescência, proporcional ao conteúdo em ácidos nucleicos.

3.1.1.2.1. Canal WNR

Este é o canal onde é feita a contagem do Número Total de Leucócitos e a Contagem Diferencial dos Basófilos e dos Eritroblastos (NRBC). Os resultados dos dois últimos são reportados em valor absoluto e em percentagem.

Através da utilização do reagente de lise é possível, por um lado diferenciar os basófilos dos restantes Leucócitos e, por outro, identificar e quantificar os NRBC.

No caso dos Leucócitos, o reagente de lise vai provocar alterações ao nível da forma da membrana celular e da estrutura interna, características para cada um deles, permitindo a diferenciação dos Basófilos com base na dispersão da luz lateral e frontal.

No caso dos NRBC, a membrana é completamente lisada e, por isso, a marcação fluorescente não é tão preservada, o que permite a sua distinção relativamente aos Leucócitos.

A identificação e quantificação dos NRBC apresenta-se como uma enorme vantagem, evitando a necessidade de corrigir a Contagem Total de Leucócitos e a Contagem Diferencial Leucocitária.

3.1.1.2.2. Canal WDF (WBC *differential*)

Este é o canal da Contagem Diferencial Leucocitária, onde é feita a contagem dos Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos e Eosinófilos, mas também a deteção de IG e Linfócitos Atípicos. Os resultados são reportados em valor absoluto e em percentagem.

Para isso, é utilizada a informação relativa à Dispersão Lateral da Luz e à Fluorescência resultante da marcação dos ácidos nucleicos.

Utiliza ainda a metodologia SAFLAS que otimiza a discriminação celular através da análise da forma da área característica de cada população celular. Esta função revela-se particularmente importante na distinção entre Monócitos e Linfócitos.

3.1.1.2.3. Canal dos Reticulócitos

Permite a classificação e diferenciação de células da linhagem eritroide, atendendo ao seu tamanho e maturação. Para isso, utiliza a informação proveniente do Detetor de Dispersão de Luz Frontal e do Detetor de Fluorescência Lateral.

Os parâmetros determinados neste canal são de extrema importância no estudo das Anemias e na monitorização da terapêutica com Ferro, na medida em que reflete a Eritropoiese.

3.1.1.2.4. Canal de Plaquetas fluorescentes

Sempre que a precisão da Contagem das Plaquetas por Impedância não pode ser garantida, o equipamento, de forma automática, ativa a função de Contagem de Plaquetas no canal de Fluorescência, permitindo um melhor estudo da população plaquetária.

Neste canal, as Plaquetas são identificadas e quantificadas através da utilização da Oxazina, um corante fluorescente da superfície do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias. Esta reação correlaciona-se com a análise dos marcadores CD41/CD61 (CD, do inglês *Cluster of Differentiation*) e minimiza as interferências na presença de fragmentos celulares.

É ainda possível determinar a IPF.

3.1.1.3. Método de Sulfato Lauril de Sódio para determinação da HGB

O Método de Sulfato Lauril de Sódio (SLS), utilizado para determinação da Concentração da Hemoglobina, baseia-se na reação entre a Hemoglobina e o SLS. Com a lise dos Eritrócitos, há libertação da Hemoglobina e oxidação do Ferro do Grupo Heme, possibilitando a formação de um complexo estável entre a Hemoglobina e o SLS que é medido fotometricamente.

3.1.1.4. Análise de líquidos biológicos

O Sysmex® permite a análise de líquidos biológicos no módulo XN-10.1, como o líquido sinovial, líquido pleural, líquido peritoneal, entre outros, evitando processamento prévio da amostra e sem necessidade de reagentes adicionais. Os parâmetros determinados nesta análise estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros determinados na análise de líquidos biológicos no Sysmex® XN-10.1.

Contagem de Leucócitos	Contagem de Eritrócitos	Contagem de Células Mononucleares
Contagem de Células Polimorfonucleares	Contagem Total de Células Nucleadas	

Paralelamente, é efetuada uma contagem celular em Câmara de *Newbauer* e preparado um citoesfregaço corado através da Coloração de *Wright* no *Aerospray® Slidestainer Cytocentrifuge*, para observação morfológica.

3.1.2. *VES Matic 30*

As determinações da VS são realizadas em amostras de sangue total colhidas com Citrato de Sódio 1:4. No estudo da doença oncológica a informação fornecida pela VS pode ser importante.

A utilização do equipamento *VES Matic 30 (Diesse)* permite uma análise rápida, por extrapolação às 2 horas.

3.1.3. *Aerospray® Slidestainer Cytocentrifuge*

O *Aerospray® Slidestainer Cytocentrifuge* permite a realização de citoesfregaços de Líquidos Biológicos para posterior observação microscópica e a execução da Coloração de *Wright* de esfregaços de sangue periférico ou medula óssea de modo semiautomático.

3.1.4. *CellaVision® DM96*

O *CellaVision® DM96* permite a rápida revisão de esfregaços sanguíneos corados, apresentando-se como uma ferramenta fundamental no Laboratório de Hematologia, na medida em que liberta o Hematologista para a análise de casos mais problemáticos.

Por Microscopia Ótica, localiza e foca as células do esfregaço, que são fotografadas por uma câmara incorporada. A identificação e classificação dos Leucócitos e a avaliação morfológica dos Eritrócitos é feita por comparação com uma base de dados, que pode ser continuamente melhorada. Desta forma, é capaz de efetuar contagens diferenciais para posterior validação.

3.1.5. Colorações citoquímicas

As Colorações citoquímicas auxiliam o diagnóstico de doenças do foro hemato-oncológico, na medida em que permitem efetuar a distinção das várias linhagens celulares, através da deteção de determinadas substâncias químicas ou enzimas.

No Serviço de Hematologia Laboratorial são executadas as seguintes colorações:

- Ácido Periódico de *Schiff* (PAS);
- Mieloperoxidase (MPO);
- Fosfatase Alcalina dos Leucócitos (LAP);
- *Perl's*;
- Naftol AS-D Cloroacetato Esterase;
- Fosfatase Ácida;
- α -Naftil Butirato Esterase;

3.2. Área de validação dos resultados

Diariamente são realizados, em média, quinhentos hemogramas, que são sujeitos a uma validação posterior. Um grupo muito representativo destes doentes encontra-se a realizar tratamentos de quimio/radioterapia. Neste grupo, entre os diversos parâmetros determinados no hemograma, a concentração de hemoglobina, o número de plaquetas e o número de leucócitos são os de maior relevância no contexto dos doentes oncológicos do IPO-Porto, de modo a determinar a viabilidade da realização do tratamento. Por esta razão, aos doentes que dependam destes resultados, é atribuído caráter de urgência e, por isso, os seus hemogramas são os primeiros a ser realizados e encaminhados/libertados para o médico.

A área da validação dos resultados é a que requer maior conhecimento teórico e maior prática laboratorial. Por esta razão, o tempo do estágio foi maioritariamente dedicado à observação de lâminas de sangue periférico por Microscopia Ótica e realização das respetivas fórmulas leucocitárias. Foram observadas lâminas de amostras diárias, com achados clinicamente relevantes, e lâminas disponibilizadas num Arquivo, organizadas pelas diferentes patologias oncológicas e acompanhadas dos processos dos doentes, incluindo estudos adicionais de Imunofenotipagem e Citogenética. Para além disto, houve oportunidade de trabalhar com a plataforma *CellaVision®* DM96, uma ferramenta intuitiva que auxiliou na consolidação do estudo das populações celulares características de cada patologia.

4. Imunologia Celular

O Serviço de Imunologia do IPO-Porto, está sob a direção da Dra. Maria Augusta Guimarães e é constituído pelo Laboratório de Imunoquímica e Autoimunidade e pelo Laboratório de Citometria de Fluxo. Visto a estagiária já ter efetuado um estágio prévio no Laboratório de Imunoquímica e Autoimunidade do Centro Hospitalar do Porto, o presente apenas foi debruçado na Citometria de Fluxo.

4.1. Citometria de Fluxo

A Citometria de Fluxo é uma ferramenta indispensável no estudo das diversas patologias do foro hemato-oncológico. Algumas das suas aplicações são o diagnóstico, a classificação e monitorização da doença, a deteção de doença residual mínima, a avaliação do prognóstico associado a determinados marcadores e a avaliação do conteúdo de DNA (Ácido Desoxirribonucleico).

O Citómetro de Fluxo é constituído por um sistema ótico, composto por um ou mais lasers, filtros e lentes, um sistema de fluidos, que permite a criação de uma pressão negativa na câmara de fluxo, que impulsiona a passagem das células, uma a uma na frente do laser, e um sistema informático, para tratamento do sinal fornecido pelo aparelho.

Este método baseia-se na Dispersão de Luz e na emissão de Fluorescência pelas células, quando atravessadas pelo laser, que chega a detetores, colocados a ângulos diferentes. A luz dispersada que incide no detetor frontal, posicionado a 180° (FS, do inglês *forward scatter*), permite inferir acerca do tamanho das células, enquanto a que incide no detetor lateral (SS, do inglês *side scatter*) a 90°, fornece informação acerca da complexidade interna celular (granularidade, lobularidade do núcleo, entre outros). Com este tipo de informação é possível identificar Linfócitos, Monócitos e Granulócitos.

No que diz respeito à Fluorescência, a luz que chega aos detetores resulta do regresso ao estado fundamental de fluorocromos excitados, que emitem luz de um comprimento de onda superior, ou seja, menos energético. Estes fluorocromos estão ligados a anticorpos monoclonais, por sua vez, ligados a antígenos na superfície ou no interior das células, que se pretendem detetar e/ou quantificar.

A informação recolhida pelos detetores é então tratada pelo sistema informático, obtendo-se gráficos que permitem analisar vários parâmetros em simultâneo. Esses gráficos podem ainda ser submetidos a uma estratégia de *gating*, que consiste na seleção dos dados correspondentes às populações celulares de interesse.

O Laboratório de Citometria de Fluxo subdivide-se em quatro áreas, correspondentes às quatro etapas da rotina laboratorial: receção e processamento das amostras, marcação,

aquisição e análise. Durante o estágio houve oportunidade de acompanhar e executar todas as etapas.

Diariamente são recebidas, em média, quinze amostras, sendo que as amostras de medula óssea, sangue periférico e líquido cefalorraquidiano (LCR) são as mais frequentes. Para além destas, houve oportunidade de trabalhar com líquido pleural, lavado broncoalveolar e fragmentos de tecido.

4.2. Área de receção e processamento de amostras

Aquando da receção e registo das amostras no *e-Deia lab*, é consultado o processo do doente, quando existente.

O LCR e outros líquidos biológicos requerem um processamento prévio à imunomarcação, que passa pela lavagem com solução de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*), de modo a eliminar reações inespecíficas.

4.3. Área de Marcação

Nesta área é tomada a decisão relativamente aos anticorpos monoclonais mais adequados para cada estudo, tendo em conta a informação clínica do doente, o tipo de produto biológico em si e o fenótipo anterior da doença, quando já caracterizado.

Os painéis de anticorpos utilizados pelo Laboratório de Citometria de Fluxo seguem as recomendações do grupo *EuroFlow*. Para cada tipo de produto biológico existem painéis de *screening* e, quando na suspeita de uma determinada patologia, são utilizados painéis mais específicos.

Após o processamento apropriado das amostras e, uma vez selecionados os painéis de marcação a seguir, os anticorpos monoclonais são adicionados à amostra e deixados a incubar por 15 minutos na obscuridade. Seguidamente, é adicionada uma solução de lise dos eritrócitos, que varia conforme o citómetro a utilizar (*FACSllysing* para o *FACS Canto* e *Veralyse* para o *FC 500* e o *NAVIOS*) e segue-se nova incubação. Após esta etapa, é feita uma lavagem com solução isotónica e, após remoção do sobrenadante, o tubo é transferido para o setor de aquisição, onde se encontram os citómetros.

Nas amostras para marcação de antigénios citoplasmáticos, não se utiliza solução de lise dos eritrócitos, mas uma solução fixadora e outra permeabilizadora, após as quais se adiciona os respetivos anticorpos.

As amostras de medula óssea são diluídas a 1:7 e submetidas a contagem do número total de leucócitos, de modo a adaptar a quantidade de amostra a adicionar ao

tubo de reação e, assim, assegurar a presença de um milhão de células, para que os resultados obtidos sejam interpretados corretamente.

Sempre que se efetue marcação de imunoglobulinas de superfície deve efetuar-se uma lavagem prévia da amostra com solução BSA.

4.4. Área de Aquisição

As amostras, reservadas ao abrigo da luz, depois de corretamente identificadas no *software* e ressuspendidas num pequeno volume de solução isotónica, são inseridas no citómetro e procede-se à leitura.

O Laboratório possui três citómetros, o *BD FACSCanto™ II*, o *FC 500* e o *Navios*.

O *BD FACSCanto™ II* é o equipamento com mais funcionamento, uma vez que permite o recurso a 8 fluorocromos diferentes, avaliando um maior número de parâmetros num único tubo de reação. É neste equipamento que são estudadas as amostras de LCR, medula óssea e sangue periférico.

O *Navios* permite o recurso a 5 fluorocromos e é utilizado para a aquisição de outros líquidos biológicos menos frequentes, como o lavado broncoalveolar, o líquido pleural, entre outros. É também neste equipamento que é lido o controlo de qualidade externo.

O *FC 500* também permite recorrer a 5 fluorocromos e é utilizado para a aquisição das amostras para determinação do conteúdo de DNA.

4.5. Setor de Análise

É nesta área que são analisados e interpretados os ficheiros que resultam da leitura das amostras nos citómetros. As propriedades físicas, como o tamanho e a complexidade celular, e as propriedades químicas, como a presença de determinados antígenos de superfície e/ou citoplasmáticos, vão permitir identificar e caracterizar o(s) clone(s) de células responsáveis pela patologia em estudo.

Para este efeito, o Laboratório de Citometria de Fluxo tem disponível a ferramenta informática *Infinicyt™* que permite a construção de gráficos biparamétricos e melhor interpretar as características celulares. Assim, as diferentes populações são agrupadas e pintadas atendendo ao seu fenótipo, permitindo determinar o seu valor percentual. No caso dos tubos de reação *TruCount™*, utilizados em amostras de sangue periférico para obtenção da contagem absoluta de células, é utilizado um número conhecido de esferas para efetuar o cálculo das diferentes populações celulares em valores absolutos.

5. Química Clínica

O Serviço de Química Clínica está sob a responsabilidade do Dr. Luís Araújo e compreende o Laboratórios Geral 1 e 2.

5.1. Laboratório Geral 1

No Laboratório Geral 1 são efetuadas as determinações de Bioquímica, Endocrinologia, Marcadores Tumorais e Marcadores Cardíacos. São recebidas cerca de quatrocentas amostras por dia o que justifica a grande automatização existente.

Durante o estágio, houve oportunidade de acompanhar e executar a rotina de trabalho deste Laboratório, nomeadamente:

- Dar entrada das amostras;
- Processar e avaliar a qualidade das amostras, tomando atitudes no sentido de solucionar os problemas encontrados;
- Gerir tubos de amostras através dos diferentes equipamentos;
- Avaliar as Cartas de Controlo de Qualidade Interno;
- Implementar estratégias de modo a otimizar os tempos dispensados em cada tarefa, rentabilizando o trabalho.

As amostras para análises bioquímicas são colhidas para tubos secos sem anticoagulante e para tubos contendo gel separador e um ativador da coagulação, aumentando a eficiência na obtenção do soro. Após a retração do coágulo, as amostras são submetidas a centrifugação (4000 rpm, 10min), para obtenção do soro, a ser utilizado nas diversas determinações. A centrífuga mais utilizada pelo Laboratório é a *Heraeus® Megafuge 1.0*. O Laboratório possui também a centrífuga refrigerada *Jouan CR3i*, utilizada em amostras com pedido de Ácido Fólico, Vitamina B12 e Hormona Paratiroide, entre outros.

Para determinação da Hemoglobina Glicada são utilizados tubos de sangue total com EDTA.

Na Fase Pré-Analítica é de extrema importância avaliar a qualidade da amostra, através da observação macroscópica do soro, detetando a presença de Fibrina, Lipemia, Icterícia e Hemólise, que podem interferir com as determinações laboratoriais; a Lipemia interfere com os ensaios turbidimétricos e a Icterícia e a Hemólise interferem com os ensaios fotométricos, devido à circulação de Bilirrubina Não Conjugada e Hemoglobina, respetivamente; a Fibrina interfere com as pipetagens. Por outro lado, uma condição de

Hemólise cursa com um desequilíbrio nas concentrações extracelulares de determinados parâmetros, por extravasamento do conteúdo intracelular.

A maioria dos equipamentos atuais já possuem a capacidade de avaliar estas características previamente à realização das determinações programadas, através do cálculo de Índices de Soro, e, assim, efetuar correções de modo a assegurar a veracidade/qualidade dos resultados.

Nas amostras com alterações nítidas ou com Índices de Soro elevados, o médico deve ser notificado de modo a ser enviada nova amostra.

5.1.1. *Olympus* OLA2500™

Após a centrifugação, as amostras são colocadas no *Olympus* OLA2500™, onde são distribuídas por secções, atendendo ao aparelho onde serão efetuadas as determinações. Este aparelho possui inúmeras funcionalidades, desde a leitura de códigos de barras, a capacidade de descapsular e de efetuar alíquotas das amostras cujas determinações sejam efetuadas em mais do que um equipamento, à organização das amostras por *racks* consoante o aparelho a que se destinam ou o parâmetro a efetuar, como é o caso da quantificação do Cálcio Iónico. No final do trabalho, as amostras são recolocadas neste equipamento, para serem vedadas com parafilme e colocadas em suportes apropriados para o seu arquivo.

Através da execução destas tarefas este aparelho presta um enorme auxílio aos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, libertando-os para a execução de outras tarefas.

5.1.2. Autoanalisador AU5800

Os parâmetros de Bioquímica Geral são efetuados no Autoanalisador AU5800 (*BeckmanCoulter*), que se baseia em tecnologias de Espectrofotometria, Turbidimetria e Potenciometria Indireta (Tabela 4).

O módulo ISE (Eléctrodo de Iões Seletivo) permite determinar quantitativamente as concentrações dos iões Sódio, Potássio e Cloreto. Por Potenciometria Indireta, efetua medições da Força Eletromotriz, em milivolts, da amostra diluída, através da utilização de eléctrodos seletivos de iões e de um eléctrodo de referência e, converte os resultados em mmol/L através de um algoritmo matemático.

Tabela 4 – Parâmetros determinados no Autoanalisador AU5800 (*BeckmanCoulter*), recorrendo a tecnologias de Espectrofotometria, Turbidimetria e Potenciometria Indireta.

Monitorização da terapêutica (TDM)		
Digoxina		
Metabolitos		
Albumina	Bilirrubina Total	Bilirrubina Conjugada
Ácido Úrico	Colesterol	Creatinina
Glicose	HDL (do inglês, <i>High Density Lipoprotein</i>)	Ureia
Amilase	Triglicerídeos	Ferro
Lactato	Proteínas totais	Magnésio
UIBC (do inglês, <i>Unsaturated Iron Binding Capacity</i>)	Cálcio	Fósforo Inorgânico
Enzimas		
ALP (do inglês, <i>Alkaline Phosphatase</i>)	AST (do inglês, <i>Aspartate Aminotransferase</i>)	ALT (do inglês, <i>Alanine Aminotransferase</i>)
CK (do inglês, <i>Creatine Kinase</i>)	Lactato Desidrogenase (LDH)	Lipase
Proteínas específicas		
Proteína C Reativa	Pré-albumina	Microalbumina
Imunoglobulina M (IgM)	Imunoglobulina G (IgG)	Imunoglobulina A (IgA)
Ferritina		Transferrina
Módulo ISE		
Sódio	Potássio	Cloreto

5.1.3. Autoanalisador *Cobas®* e 601

O modular *Cobas®* e 601, pertencente à série *Cobas®* 6000 (*Roche*), é o equipamento utilizado para as determinações de parâmetros de Endocrinologia e Marcadores Tumoriais (Tabela 5), assente na tecnologia de Eletroquimioluminescência. Devido à sua alta sensibilidade permite efetuar determinações de parâmetros que existam em muito baixas concentrações no soro.

Atendendo ao elevado volume de amostras diárias analisadas, são utilizados dois módulos *Cobas®* e 601 em cadeia.

Tabela 5 - Parâmetros determinados no Cobas® e 601 (Roche).

Função da Tireoide		
ATG (Anti-tiroglobulina)	ATPO (Anti-tiroperoxidase)	TG (Tiroglobulina)
T3 (Triiodotironina)	T4 (Tiroxina)	T3 Livre
T4 Livre	TSH (Hormona Tiroestimulante)	
Função Hormonal		
FSH (Hormona Foliculoestimulante)	LH (Hormona Luteinizante)	β-hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana)
Prolactina	Testosterona	ACTH (Hormona Adrenocorticotrófica)
Cortisol		
Nutrientes Eritropoiéticos		
Vitamina B12		Ácido Fólico
Marcadores Tumorais		
α-fetoproteína	CA 15.3 (Antigénio do Cancro da Mama)	CA 19.9 (Antigénio do Cancro Colorretal e do Pâncreas)
CEA (Antigénio Carcino-embrionário)	PSA (Antigénio específico da Próstata) Livre	PSA Total
CA 125 (Antigénio do Cancro do Ovário)		

5.1.4. Autoanalisador Cobas® e 411

Para determinação de Marcadores Cardíacos e de alguns parâmetros de determinação periódica semanal é utilizado o Cobas® 4000, nomeadamente o módulo Cobas® e 411 (Roche), que se baseia na Eletroquimioluminescência (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros determinados no Cobas® e 401 (Roche).

Função Cardíaca		Parâmetros doseados semanalmente
Mioglobina	Troponina	Ca 72.4
PTH	CK-MB	TRAB (Autoanticorpos do recetor da TSH)
Procalcitonina		IgE (Imunoglobulina E)
		NT-Pro BNP (<i>N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide</i>)
		SHBG (<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>)

5.1.5. Immulite® 2000

O *Immulite® 2000 (Siemens)* é utilizado para as determinações de alguns parâmetros hormonais (Tabela 7), assente em imunoensaios de quimioluminescência. Dependendo de se tratar de um ensaio competitivo ou do tipo *sandwich*, o sinal fornecido pelo equipamento será inversamente ou diretamente proporcional à concentração do analito, respetivamente.

Tabela 7 - Parâmetros determinados no *Immulite® 2000 (Siemens)*.

Parâmetros determinados no Immulite 2000			
Androstenediona	Insulina	Eritropoietina	Progesterona
Sulfato de Dehidroepiandrosterona	Péptido C	B2-microglobulina	Estradiol
Calcitonina	Gastrina	GnRH (<i>Gonadotropin-releasing Hormone</i>)	IL2R (Recetor da Interleucina 2)
IL6 (Interleucina 6)	IgF1 (<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>)		

5.1.6. GEM Premier 3000

No Laboratório de Bioquímica, O GEM Premier 3000 (*Instrumentation Laboratory*) é utilizado para efetuar Gasimetrias Arteriais, doseamentos de Cálcio Iónico e ainda a confirmação de alguns Ionogramas, utilizando para isso métodos de Potenciometria direta e Amperometria. Este equipamento efetua uma calibração no final de cada determinação.

É também utilizado para confirmar os valores obtidos no doseamento da Glicose pelo AU5800 em situações de resultados exageradamente elevados que, a confirmarem-se, podem resultar de amostras diluídas, colhidas em doentes submetidos a reperfusão de soro. Neste caso, deve ser convocada uma nova amostra.

Na realização destas determinações é importante a avaliação da qualidade da amostra, nomeadamente se tem volume suficiente e se não contém bolhas de ar.

As Gasimetrias Arteriais devem ser realizadas logo que a amostra chegue ao Laboratório, pois os parâmetros determinados são de carácter urgente para o médico, uma vez que permitem detetar Dequilíbrios Ácido-base, permitindo efetuar ajustes na terapêutica. São avaliadas as Pressões Parciais de Oxigénio e Dióxido de Carbono e o pH da amostra e calculados outros parâmetros como a concentração do Ião Bicarbonato, a concentração de Dióxido de Carbono, entre outros.

5.1.7. *Vapro®*

Para a determinação da Osmolalidade, ou seja, do número de moles de solutos por quilograma de solvente (água), é utilizado o *Vapro®* (*ELITechGroup*). A partir da descida de Pressão de Vapor da amostra é possível inferir indiretamente acerca da Osmolalidade, por comparação com a Pressão de Vapor correspondente à temperatura ambiente. O equipamento é sensível às oscilações externas da temperatura pelo que, previamente à introdução da amostra a analisar, é inserido um disco de papel sem soluto, que vai sendo submetido a determinações consecutivas, até se verificar estabilidade térmica. Esta determinação é importante para o estudo do controlo da ingestão de líquidos, nomeadamente da resposta do Hipotálamo, responsável pela produção da Hormona Antidiurética (ADH), que determina a reabsorção de água nos túbulos renais. Por outro lado, é relevante no estudo da Hiponatremia.

5.1.8. *Adams A1C HA8160*

A determinação da Hemoglobina Glicada (HbA1c) permite uma avaliação mais duradoura dos níveis de Glicose (últimos 2 a 4 meses) e é muito utilizada para controlo dos Níveis de Glicémia em doentes com diabetes *mellitus* e no estudo das Talassemias. Para este parâmetro bioquímico, é utilizado o equipamento *Adams A1C HA8160* (*Arkray*), que assenta na tecnologia de HPLC com leitura por Espectrofotometria.

5.2. Laboratório Geral 2

Este Laboratório inclui uma área para análise de urinas, fezes e líquidos biológicos, uma área para as determinações de Farmacologia, uma área para a realização de Radioimunoensaios (RIA) e ainda uma área para a realização de técnicas de HPLC.

5.2.1. Setor de Urinas, Fezes e Líquidos Biológicos

Neste Setor é efetuada a Análise Sumária de Urina, a Contagem Automática de Elementos Figurados por Citometria de Fluxo, a pesquisa da Hormona β -hCG e de Sangue Oculto nas Fezes por Imunocromatografia e Espermogramas.

O tipo de amostras predominante é a urina, sendo recebidas, em média, cerca de trinta amostras por dia. Estas podem ser de vinte e quatro horas ou amostras ocasionais, resultantes de uma única micção.

As amostras de urinas de vinte e quatro horas chegam ao Laboratório para doseamento de aminas biogénicas por HPLC, ou para determinação de parâmetros bioquímicos, como o Cortisol Urinário ou as Proteínas Totais, recorrendo ao Autoanalisador AU5800. O volume das amostras é avaliado no momento da sua receção.

As amostras ocasionais são transferidas para tubos apropriados (10mL) e submetidas a Análise Sumária de Urina, realizado no *Aution-Max®*, e a análise da urina por Citometria de fluxo no *Sysmex®* UF-500i.

Durante o período de permanência neste Setor, o tempo foi maioritariamente dedicado ao processamento das amostras de urina, interpretação da informação fornecida pelos equipamentos e observação de Sedimentos Urinários. Houve também oportunidade de presenciar Testes de Gravidez, pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes e a realização de um Espermograma.

5.2.1.1. Pesquisa da Hormona β -hCG por Imunocromatografia

A pesquisa da Hormona β -hCG é um pedido bastante frequente pois determinados tratamentos não podem ser realizados durante a gravidez. O teste é muito simples e baseia-se na pesquisa da Hormona β -hCG por Imunocromatografia através da utilização de anticorpos monoclonais específicos.

5.2.1.2. Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes por Imunocromatografia

A pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes é bastante utilizada no rastreio do Cancro do Cólon, sendo sempre confirmada por Colonoscopia. Este teste pode também auxiliar o diagnóstico de Anemias. O princípio do teste é a Imunocromatografia, através da utilização de anticorpos específicos para a Hemoglobina.

5.2.1.3. Espermograma

O Espermograma é realizado em doentes jovens do sexo masculino, nos quais tenha sido diagnosticada uma patologia do foro oncológico e que tenham sido submetidos a Quimioterapia, uma vez que este tipo de tratamentos afeta as células em divisão, como é o caso das células gaméticas. Avalia-se ao Microscópio Ótico a qualidade, quantidade e morfologia dos Espermatozoides, bem como a presença de Eritrócitos e Leucócitos.

5.2.1.4. Análise Sumária de Urina - *Aution-Max®*

O equipamento *Aution-Max®* realiza uma análise físico-química sumária da urina através da sua reação com tiras impregnadas com reagentes específicos e respetiva leitura por Refletometria. A concentração de uma determinada substância presente pode ser medida como uma função indireta da luz refletida.

Os parâmetros bioquímicos determinados estão listados na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros bioquímicos determinados na Análise Sumária da Urina, recorrendo ao *Aution- Max®*.

Parâmetros de natureza química		
Glicose	Proteínas	Bilirrubina
Urobilinogéneo	pH	Grupo Heme
Corpos Cetónicos	Nitritos	Esterase Leucocitária
Parâmetros de natureza física		
Cor	Turbidez	Gravidade Específica

5.2.1.5. Contagem de Partículas Urinárias por Citometria de Fluxo no *Sysmex®* UF-500i

Posteriormente ao exame sumário, as amostras de urina são submetidas a uma contagem de partículas por citometria de fluxo, recorrendo ao *Sysmex®* UF-500i, que envolve duas tecnologias: citometria de fluxo de fluorescência com focagem hidrodinâmica e condutividade.

A classificação das partículas é conseguida através da informação obtida pelos detetores frontal e lateral (tamanho e complexidade, respetivamente) e ainda da utilização de marcadores fluorescentes de ácidos nucleicos. Avalia ainda a turbidez da amostra.

Este equipamento é constituído por dois canais diferentes: um para análise bacteriana e outro para as restantes partículas.

Permite distinguir entre contaminação, inflamação, infeção bacteriana ou micótica.

Os parâmetros determinados pelo *Sysmex®* UF-500i são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros determinados pelo *Sysmex®* UF-500i.

Células		
Células totais	Eritrócitos	Leucócitos
Células epiteliais	<i>Small round cells</i> (SRC)	Espermatozóides
Bactérias	Fungos	Muco
Cilindros e cristais		
Cilindros totais	Cilindros patológicos	Cristais
Outros parâmetros		
Morfologia eritrocitária	Outras partículas	Condutividade

5.2.1.6. Análise do sedimento urinário por Microscopia Ótica

A integração da informação obtida pelos dois equipamentos de análise da urina permite efetuar a triagem das amostras, reduzindo a quantidade de sedimentos urinários observados ao Microscópio Ótico, diminuindo assim a carga de trabalho diário. As amostras são selecionadas para observação microscópica sempre que se verifique um ou mais dos seguintes critérios:

- Discordância entre a informação fornecida pelos dois equipamentos;
- Presença de cilindros patológicos ou cristais;
- Proteinúria;
- Hematúria ou Leucocitúria;
- Presença de leveduras.

A preparação do sedimento urinário passa por centrifugação (1500-2000 rpm, 5min), decantação e sua ressuspensão em 1 mL.

Na observação do sedimento urinário, devem ser semiquantificadas as células epiteliais do trato urinário inferior e superior por campo de ampliação de 100x e os leucócitos e eritrócitos por campo de ampliação de 400x. Na presença de cilindros ou cristais, estes não só devem ser semi-quantificados no campo de 100x como devem ser classificados, atendendo à sua morfologia (hialinos, granulosos, serosos ou gordurosos). As células epiteliais de descamação, provenientes do trato urinário inferior, servem como controlo da qualidade da colheita e, quando superiores a cinquenta por campo, a amostra deve ser rejeitada e solicitada nova colheita.

Outros achados como o muco, a presença de fungos, ou a presença de infeção polimicrobiana devem ser referenciados.

Nas Figuras 4, 5, 6 e 7 são apresentados alguns achados dos sedimentos urinários observados por Microscopia Ótica durante o estágio.

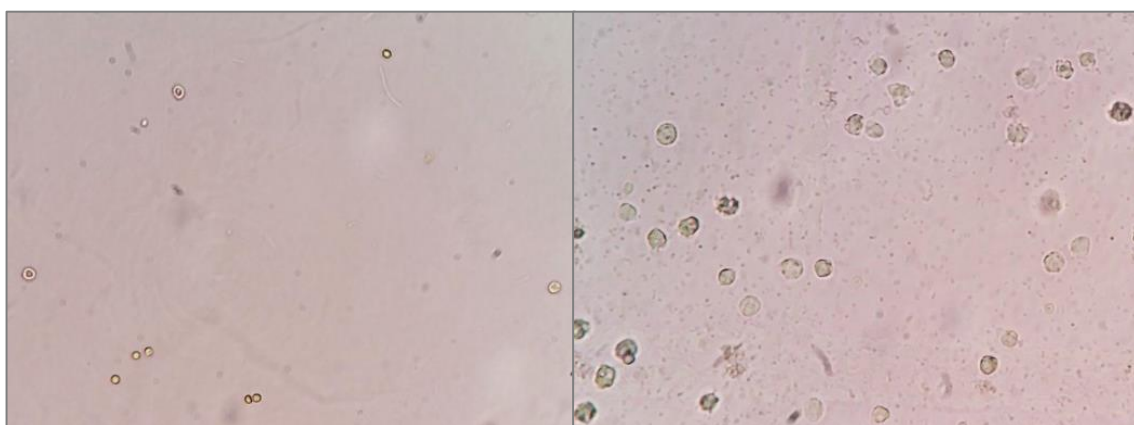


Figura 4 – Alguns achados dos sedimentos urinários observados por Microscopia Ótica (ampliação de 400x): à esquerda, eritrócitos; à direita, leucócitos e bactérias.

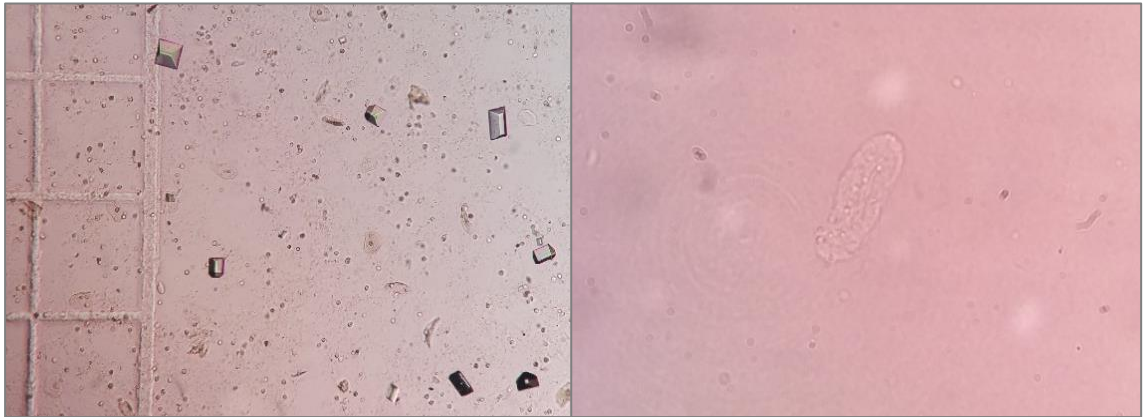


Figura 5 – Alguns achados dos sedimentos urinários observados por Microscopia Ótica (ampliação 100x): à esquerda, Cristais de Fosfato Triplo; à direita, Cilindro Hialino.

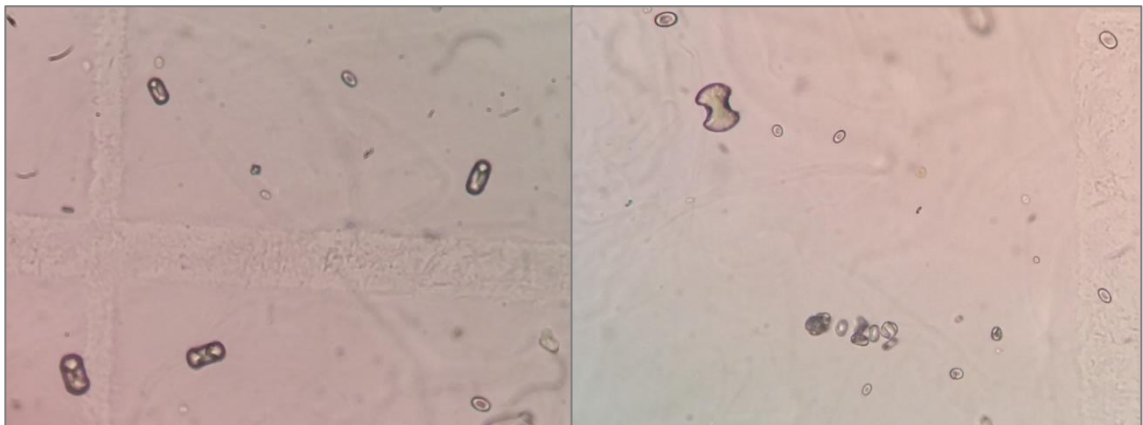


Figura 6 – Cristais de Oxalato de Cálcio Monohidratados encontrados num sedimento urinário, observado por Microscopia Ótica (ampliação 400x).

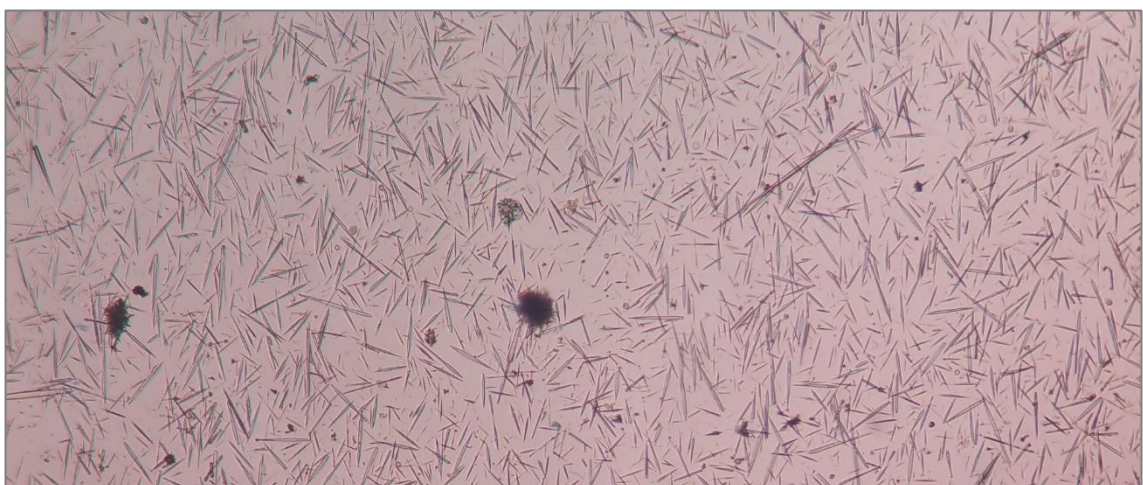


Figura 7 - Cristais de Tirosina, encontrados num sedimento urinário, observado por Microscopia Ótica (ampliação 100x).

5.2.2. Setor de Farmacologia

No Setor de Farmacologia efetua-se o doseamento de determinados imunossupressores em amostras de sangue total e de alguns antipiléticos e antibióticos em amostras de soro. As determinações têm como objetivo monitorizar a terapêutica, de modo a atingir a concentração ideal para o doente, garantindo o efeito terapêutico sem, no entanto, apresentar toxicidade para o organismo.

O doseamento do Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas (SCC), um marcador tumoral, também tem lugar neste Setor.

De entre os fármacos doseados (Tabela 10), as Ciclosporinas e o Tacrolimus requerem uma etapa de processamento prévia que envolve a adição de determinadas soluções e posterior centrifugação (10800 rpm, 5min).

As Ciclosporinas distribuem-se no interior dos eritrócitos e por isso requerem um pré-tratamento com uma solução de solubilização, para lisar os eritrócitos, e com uma solução de precipitação para extrair o fármaco. Nas amostras para doseamento de Tacrolimus apenas é adicionada uma solução de precipitação, uma vez que o fármaco se encontra ligado a proteínas plasmáticas e aos eritrócitos.

Tabela 10 - Lista de fármacos doseados pelo Setor de Farmacologia do Serviço de Química Clínica, agrupados pela classe terapêutica.

Classe terapêutica	Fármaco	Equipamento
Antibióticos	Amicacina	<i>Cobas Integra 400 plus</i>
	Gentamicina	
	Vancomicina	
Anticonvulsivantes	Ácido Valproico	
	Fenobarbital	
	Fenitoína	
	Carbamazepina	
	Benzodiazepina	
Broncodilatadores	Teofilina	
Imunossupressores	Ciclosporina	<i>Architect i 1000</i>
	Tacrolimus	
	Metotrexato	
Cardiotrópicos	Digoxina	AU 5800

Para o doseamento farmacológico existem dois equipamentos: o *Architect i 1000* e o *Cobas Integra 400 plus*.

O *Architect i 1000*, que é baseado na tecnologia de Quimioluminescência, é o equipamento utilizado para o doseamento dos fármacos imunossupressores e do SCC. A

concentração do analito e a quantidade de sinal emitido pelo aparelho relacionam-se inversamente pois trata-se de um ensaio competitivo.

O *Cobas Integra 400 plus* é utilizado para o doseamento dos restantes fármacos e baseia-se na tecnologia de Fluorescência polarizada, sendo a concentração dos analitos diretamente proporcional à quantidade de luz polarizada emitida.

5.3. Setor de RIA

A Técnica de Radioimunoensaio Competitivo é utilizada para o doseamento das seguintes moléculas:

- Cromogranina A, no diagnóstico de tumores neuroendócrinos;
- Enolase Neurónio-Específica, marcador tumoral neuroendócrino;
- Testosterona livre, utilizada no diagnóstico de hirsutismo derivado de hiperandrogenismo;
- 17-OH-progesterona, para o diagnóstico e tratamento de hiperplasia adrenal congénita.

O equipamento utilizado é o *DPC gamma c12 medi*.

5.4. Laboratório de HPLC

O doseamento das Catecolaminas e dos seus metabolitos no plasma e na urina são parte integrante do diagnóstico de Tumores do Sistema Simpatoadrenal, como os Feocromocitomas e os Neuroblastomas. O método de referência para estas determinações é o HPLC.

O Laboratório dispõe de três painéis de HPLC diferentes, que lhe permite a separação de três grupos de moléculas:

- Separação das Catecolaminas: Dopamina, Norepinefrina e Epinefrina;
- Separação da Metanefrina e Norepinefrina;
- Separação do Ácido Homovanílico, do Ácido Vanililmandélico e do 5-HIAA.

As amostras recebidas são urinas de vinte e quatro horas, colhidas com HCl a 6M, que são submetidas a um pré-tratamento (específico para cada molécula), que permite a obtenção de um eluado purificado.

Após a injeção das amostras no equipamento, as substâncias são separadas por cromatografia e detetadas eletroquimicamente, sendo que a cada substância corresponde um tempo de retenção característico.

A avaliação dos cromatogramas é feita por comparação da área dos picos a dosear com a área do padrão interno.

6. Virologia

O Serviço de Virologia está sob a direção da Dra. Inês Baldaque e compreende o Laboratório de Virologia Geral e o Laboratório de Biologia Molecular.

Para o diagnóstico das infeções virais podem ser utilizadas várias técnicas, atendendo ao tipo de amostra, fiabilidade e custo do teste, rapidez do diagnóstico e situação clínica do doente.

6.1. Laboratório de Virologia Geral

A maioria dos vírus que são alvo de estudo no Serviço de Virologia, não sendo problemáticos na população imunocompetente, podem desencadear complicações graves em doentes imunodeprimidos e imunocomprometidos, como é o caso dos doentes do IPO-Porto, revelando-se uma importante causa de morbilidade e mortalidade. Por esta razão, os doentes são avaliados na fase pré-transplantação e reavaliados pós-transplantação. Na Tabela 11 é apresentada uma lista destes vírus, bem como a metodologia utilizada. Há ainda um conjunto de vírus cujos testes o IPO-Porto não realiza, que são enviados para o Hospital de São João.

Tabela 11 - Lista de vírus estudados no Laboratório de Virologia Geral e metodologias utilizadas.

Vírus	Metodologia
Hepatite A (HAV)	ELFA (Serologia IgG e IgM)
Citomegalovírus (CMV)	ELFA (Serologia IgG e IgM) Imunoperoxidase (Antigenemia)
Varicela Zona (VZV)	ELFA (Serologia IgG)
<i>Epstein-Barr</i> (EBV)	ELISA (Serologia VCA IgG, VCA IgM, EA e NA) Imunocromatografia (deteção de anticorpos heterófilos)
Herpes Simplex 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2)	ELISA (Serologia IgG e IgM)
Parvovírus B19 (PB19)	ELISA (Serologia IgG e IgM)
Respiratório Sincicial (RSV)	Imunofluorescência Direta (deteção de antígeno)
Influenza A (IA) e B (IB)	
Parainfluenza 1 (P1), 2 (P2), 3 (P3)	
Adenovírus (ADV)	
Adenovírus (ADV)	Imunocromatografia (deteção de antígeno)
Rotavírus (RTV)	

6.1.1. Antigenemia de CMV por Imunoperoxidase

A determinação da Antigenemia do CMV por Técnica de Imunoperoxidase é o método de escolha pelos clínicos do IPO-Porto para monitorização da infeção por CMV, uma vez que, na prática clínica, encontram uma melhor correlação com a terapêutica. O antígeno semiquantificado é a fosfoproteína pp65.

Para a realização deste teste, chegam diariamente ao Laboratório, em média, trinta amostras de sangue total, duas por doente. É uma técnica manual, desde o processamento da amostra, até à observação das lâminas ao Microscópio Ótico, pelo que, o tempo do estágio, foi maioritariamente dispensado na compreensão e execução das diferentes etapas que esta engloba.

O CMV é um vírus leucotrópico, pelo que, antes de se iniciar o processamento das amostras, são consultados os resultados do Hemograma, e verificado o valor de leucócitos, mais concretamente de neutrófilos. Em situações de neutropenia ($< 1 \times 10^3$ células) opta-se pela realização de um teste alternativo: quantificação de CMV por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em Tempo Real, realizada no Laboratório de Biologia Molecular.

O Método da Imunoperoxidase envolve duas etapas: a preparação de um citoesfregaço e a sua coloração. Primeiramente, as amostras são submetidas a uma série de lavagens com Tampão Fosfato Salino (PBS), a lise dos eritrócitos com Cloreto de Amónio, e centrifugações, de modo a obter uma suspensão de leucócitos de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/mL. As lâminas são preparadas através da execução automática de citoesfregaços, recorrendo à *Cytospin* (550 rpm, 5min). A coloração resulta da utilização do anticorpo monoclonal C10/D11 e de um anticorpo secundário acoplado à Imunoperoxidase, que, na presença do substrato (Corante 3-amino-9-etilcarbazol) e de Peróxido de Hidrogénio, catalisa uma reação de hidrólise, que resulta no desenvolvimento de uma cor castanho-avermelhada dos núcleos positivos para CMV. As restantes células são coradas com Hematoxilina de *Mayer*.

Na observação das lâminas coradas ao Microscópio Ótico é efetuada a contagem de todas as células positivas encontradas. Em caso de positividade (≥ 1 célula castanho-avermelhada, Figura 8), efetua-se a contagem do número total de células em três campos, calcula-se a média e aplica-se um fator de conversão associado ao Microscópio, de modo a inferir acerca da totalidade de células positivas presentes por 50 000 leucócitos.

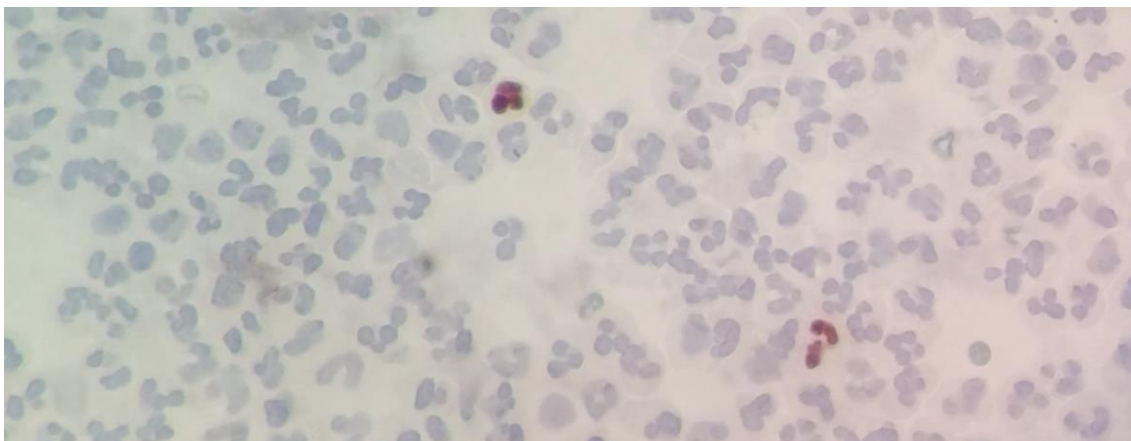


Figura 8 - Leucócitos infetados com CMV, detetados por Técnica de Imunoperoxidase (ampliação 400x).

6.1.2. Detecção de vírus respiratórios por Imunofluorescência Direta

O diagnóstico viral das infecções respiratórias é essencial para a aplicação da terapêutica e medidas de prevenção adequadas. As amostras respiratórias não são um produto recebido regularmente, surgindo em média um caso por semana, ou mais, dependendo dos surtos sazonais. A deteção do vírus por Imunofluorescência Direta permite um diagnóstico rápido das infecções por ADV, RSV, IA e IB e PI1, PI2 e PI3.

No Laboratório de Virologia Geral é realizado o *screen* destes vírus respiratórios, através do pré-tratamento da amostra respiratória, que inclui lavagens com PBS e centrifugações (1200 rpm, 10min), e, posterior preparação de uma lâmina, e da utilização de um *pool* de anticorpos monoclonais para esses vírus. A observação de uma inclusão nuclear e citoplasmática de fluorescência verde (Figura 9), por comparação com poços controlo, é indicativo de um resultado positivo. Em caso de *screen* positivo, o estudo prossegue para uma deteção específica, permitindo identificar o vírus presente na amostra.

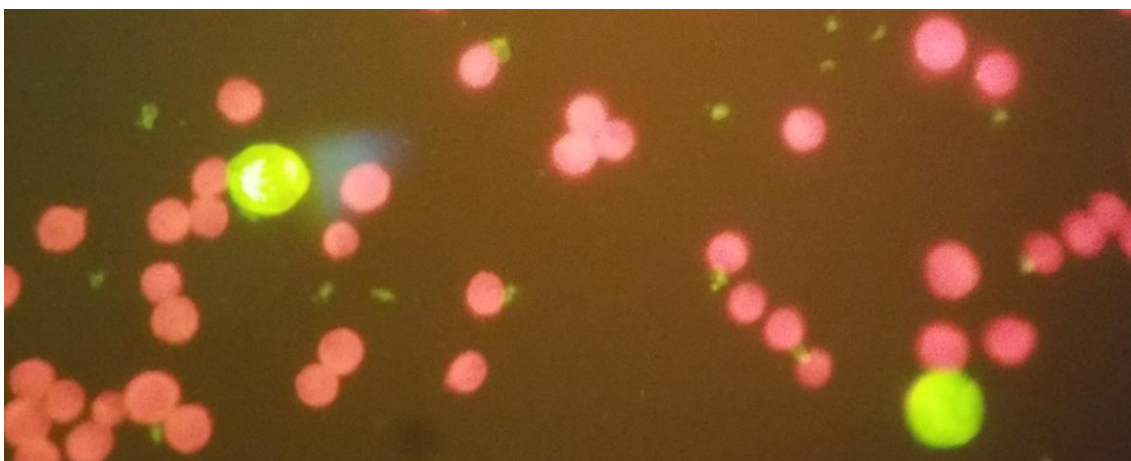


Figura 9 – Células infetadas com vírus respiratórios (*screen*), detetadas por Imunofluorescência Direta (ampliação 400x).

6.1.3. Serodiagnóstico Vírico

Uma parte do Diagnóstico Laboratorial das infecções virais passa pela pesquisa de anticorpos específicos em amostras de soro. No Laboratório de Virologia Geral, são utilizados dois equipamentos que se baseiam em princípios diferentes: Mini VIDAS® e *Gemini Stratec*.

6.1.3.1. Mini VIDAS®

O mini VIDAS® (*Biomerieux*) é um sistema automatizado de imunoensaios baseado na técnica de *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA), que associa o Método Imunoenzimático por *Sandwich* em 2 etapas, com uma detecção final por Fluorescência, o que garante uma maior sensibilidade relativamente a uma *Enzyme-linked Immunossorbent Assay* (ELISA) convencional.

O seu sistema de barretes e cones permite a realização dos testes de forma rápida e fiável.

Neste Laboratório o mini VIDAS® é utilizado para:

- Detecção de anticorpos IgM e IgG específicos de CMV;
- Detecção de anticorpos IgG de VZV;
- Detecção de anticorpos IgM de HAV;
- Detecção dos anticorpos totais de HAV.

6.1.3.2. *Gemini*

O *Gemini* (*Stratec*) é um equipamento automatizado, que tem como princípio reações ELISA, com detecção por Espectrofotometria. Neste tipo de ensaios, o antígeno viral encontra-se adsorvido nos poços das microplacas e há desenvolvimento de um produto de cor, quando na amostra estão presentes anticorpos específicos dos antígenos que se pretende pesquisar.

No Laboratório de Virologia Geral este equipamento é utilizado para os seguintes testes:

- Detecção de anticorpos IgM e IgG específicos de HSV-1;
- Detecção de anticorpos IgM e IgG específicos de HSV-2;
- Detecção de anticorpos do *early antigen* (EA) e do *nuclear antigen* (NA) do EBV;
- Detecção de anticorpos IgM e IgG do antígeno da cápside viral (VCA) de EBV;
- Detecção de anticorpos IgM e IgG de PB19;

6.1.4. Detecção de Rotavírus e Adenovírus em fezes por Ensaio Imunocromatográfico

A pesquisa de Rotavírus e Adenovírus em amostras de fezes é realizada em doentes com episódios de diarreia de repetição.

O teste atualmente utilizado pelo Serviço de Virologia para esta determinação é o *Combi-Strip*, que se baseia num Ensaio de Imunocromatografia. O kit inclui tiras de reação e um tampão de diluição para pré-tratamento da amostra. Após um determinado período de incubação, é possível avaliar a presença ou ausência de bandas para um ou ambos os vírus. A presença da banda controlo permite validar o teste.

Durante o estágio teve a oportunidade de executar cinco testes que deram negativo. Uma das amostras estava hemorrágica, no entanto não houve interferência, pois caso existisse, traduzir-se-ia num falso positivo.

6.1.5. Detecção de Anticorpos Heterófilos de EBV por Ensaio Imunocromatográfico

O *Clearview® IM (Alere™)* (Figura 10) permite a deteção de Anticorpos Heterófilos de EBV, maioritariamente do tipo IgM, em 80-90% dos casos de infeção aguda, que surgem 1-12 semanas após o início da mononucleose infecciosa, podendo os títulos persistir por mais um ano. Utiliza como antígeno imobilizado na membrana de nitrocelulose, uma glicoproteína de eritrócitos bovinos, o que lhe confere alta especificidade e que evita a necessidade de pré-tratamento da amostra.



Figura 10 - Testes imunocromatográficos para a deteção de Anticorpos Heterófilos de Mononucleose Infecciosa. Em cima, um resultado negativo, com apenas a linha controlo visível; em baixo, um resultado positivo, com ambas as linhas de controlo e de teste positivas.

6.2. Laboratório de Biologia Molecular

No Laboratório de Biologia Molecular é efetuado o diagnóstico molecular das infecções víricas. Este Laboratório participa também em programas de rastreio de infecções por vírus associados ao desenvolvimento de neoplasias.

A Tabela 12 sintetiza os testes moleculares efetuados, bem como as técnicas utilizadas para o efeito. Neste Laboratório são estudados os seguintes vírus: Influenza A (IA) e B (IB), Vírus Respiratório Sincicial (RSV), Herpes Simplex 1 e 2 (HSV-1 e -2), Herpes Humano 6 (HHV-6), *John Cunningham* (JCV), Adenovírus (ADV), *Epstein-Barr* (EBV), Citomegalovírus (CMV), o vírus BK (BKV) e o Vírus do Papiloma Humano (HPV).

Durante o estágio não houve oportunidade de acompanhar todos os protocolos com que o Laboratório trabalha, uma vez que, a sua realização é muitas vezes periódica e dependente da quantidade de amostras recebidas. No entanto, foi possível acompanhar o fluxo de trabalho, que passa pelo processamento das amostras, extração de ácidos nucleicos e sua amplificação. Nesta parte do trabalho são descritas as metodologias em que teve oportunidade de participar.

Tabela 12 - Lista de testes realizados no Laboratório de Biologia Molecular e técnicas utilizadas.

Teste molecular	Técnica
Deteção de IA	PCR em Tempo Real
Deteção de IB	
Deteção do RSV	
Deteção de HSV-1 e HSV-2	
Deteção de JCV	
Carga Viral de ADV	Quantificação por PCR em Tempo Real
Carga Viral de BKV	
Carga Viral de EBV	
Carga Viral de CMV	
Carga Viral de HHV-6	
Deteção de HPV alto risco	Captura híbrida
Genotipagem de HPV alto risco e outros (HPV6/11)	PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

6.2.1. Extração de ácidos nucleicos

Para efetuar a detecção e quantificação da carga viral é necessário extrair os ácidos nucleicos das amostras, para posteriormente efetuar a sua amplificação.

A extração é realizada recorrendo ao kit comercial *MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation (Roche)* e ao equipamento *MagNa Pure Compact (Roche)* que através da utilização de um reagente de lise, de proteinase K, e, de partículas magnéticas que se ligam aos ácidos nucleicos, permite a formação de um eluado concentrado em ácidos nucleicos.

Em amostras de tecidos, de modo a assegurar a correta extração dos ácidos nucleicos, existe uma fase de pré-tratamento recorrendo ao kit comercial *MagNa Pure DNA Tissue Lysis Buffer*, que contém tampão de lise de tecidos e proteinase K.

Em amostras de tecidos parafinados fixados com formalina utiliza-se xilol, para dissolver a parafina, e uma incubação a alta temperatura, para reverter as ligações cruzadas de formalina, que podem ter efeitos inibitórios na PCR, através da utilização do “*QIAmp DNA FFPE Tissue*”.

6.2.2. Genotipagem de HPV por PCR-RFLP

Após extração dos ácidos nucleicos, efetua-se uma reação de PCR convencional utilizando os *primers* degenerados MY09/11, que amplificam um fragmento de 450 pb, correspondente a uma região do gene HPV L1. Após análise da eletroforese em gel de agarose a 1,5% com Tris-Borato-EDTA (TBE), as amostras positivas prosseguem o estudo, por genotipagem *in house* recorrendo à técnica de RFLP. Esta técnica foi implementada com base no estudo descrito por Nobre RJ *et al*, 2008. A interpretação é realizada sempre por duas pessoas independentes.

6.2.3. Quantificação absoluta das cargas virais de ADV, CMV, EBV, BKV e HHV-6 por PCR em Tempo Real

O PCR em Tempo Real é uma variante da técnica de PCR convencional, que permite a quantificação de DNA ou RNA através da utilização de *primers* e sondas fluorescentes específicas para a sequência em estudo.

À medida que a amplificação decorre, as sondas hibridam com o produto formado e existe um aumento proporcional de fluorescência, que é detetado. Através da análise de curvas de fluorescência, que relacionam os ciclos de amplificação com a fluorescência emitida e, recorrendo à construção de uma curva padrão, é possível calcular a quantidade de DNA presente inicialmente na amostra em estudo.

Para isso, é estabelecida uma *baseline*, que define o ruído, e o *Threshold*, que define o nível de sinal correspondente a um aumento estatisticamente significativo da

fluorescência relativamente à *baseline*. O *Cycle Threshold* (C_T) representa o ciclo em que é atingido o *Threshold* e relaciona-se inversamente com a quantidade de DNA da amostra, pelo que, será tanto menor quanto maior a carga de DNA. Por interpolação do valor do C_T da amostra em estudo na curva padrão, é possível inferir acerca da quantidade de DNA presente inicialmente.

Esta técnica é utilizada pelo Laboratório de Biologia Molecular para a identificação e quantificação do ADV, CMV, EBV, BKV e HHV-6, no equipamento *ABI Prism® 7300 Series* (*Applied Biosystem*) e recorrendo a um kit comercial (*Nanogen®*).

Para cada um dos vírus a pesquisar são utilizados *primers* e sondas específicos de uma determinada região do genoma. Assim, quando ocorre amplificação da região alvo, há ligação à sonda marcada com o fluorocromo FAM™, produzindo um sinal de fluorescência.

Como controlo positivo de amplificação são utilizados *primers* e sondas fluorescentes específicas para a β -globina. Neste caso, as sondas estão marcadas com o fluorocromo VIC®.

6.2.4. Detecção de IA, IB, RSV, variante A/H1N1, HSV-1 e HSV-2 por PCR em Tempo Real

Para a deteção de IA, IB, RSV, HSV-1 e HSV-2 é utilizado o PCR em Tempo Real e o equipamento 3M™ *Integrated Cycler* (*Focus Diagnostics*). Quando é detetado o vírus IA, procede-se à deteção da sua variante pandémica H1N1, através da utilização do kit “*Real Time Ready Influenza A/H1N1 Set*” e do equipamento *LightCycler® 1.5*. O fragmento alvo de amplificação neste caso é uma parte do gene da hemaglutinina 1.

São utilizadas sondas de oligonucleótidos específicas da região em estudo marcadas com fluorocromos, que se baseiam no princípio *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET). Este princípio consiste na transferência de energia que ocorre entre fluorocromos próximos. Existem dois tipos de sondas: as sondas de hibridação e as sondas de hidrólise. As sondas de hibridação, aquando do *annealing*, transferem energia entre si, devido à proximidade entre os seus fluoróforos. A fluorescência emitida pela sonda dadora, quando excitada por um determinado comprimento de onda (λ), é transferida para a sonda recetora, que emite fluorescência de um λ diferente. Nas sondas de hidrólise, cada sonda contém dois marcadores fluorescentes, o *quencher* e o *reporter*. Durante a etapa de amplificação, a *TaqMan®* polimerase cliva a sonda de hidrólise, separando o *quencher* e o *reporter*. O *reporter* fica assim desbloqueado e emite fluorescência quando excitado com um determinado λ . Para os dois tipos de sondas utilizados, a quantidade de fluorescência detetada é diretamente proporcional à quantidade de DNA amplificado.

7. Microbiologia

O Serviço de Microbiologia está sob a direção da Dra. Maria Augusta Guimarães e compreende os Laboratórios de Bacteriologia, Micologia, Biologia Molecular, Serologia e Micobactérias.

O diagnóstico laboratorial microbiano passa pelo isolamento e identificação do(s) agente(s) responsável(eis) por determinada situação clínica, bem como pela avaliação da sua suscetibilidade aos antimicrobianos disponíveis.

Diariamente são recebidas amostras que podem ter as mais variadas origens: urina, fezes, lavado broncoalveolar (LBA), lavado brônquico (LAB), expetoração, secreções brônquicas (SB), zaragatoas nasais, exsudados, líquido cefalorraquidiano (LCR), hemoculturas, fragmentos de tecido, pontas de cateter e outros líquidos biológicos.

Para alcançar identificações inequívocas é necessário semear os produtos nos meios de cultura apropriados e recorrer a isolamentos de modo a garantir a pureza das culturas. Alguns meios de cultura auxiliam na orientação do diagnóstico, uma vez que possuem características seletivas e/ou diferenciais. A coloração assume também um papel fundamental, na medida em que permite caracterizar morfológicamente o(s) agente(s).

As amostras com suspeita de infecção por micobactérias são tratadas numa área isolada – o Laboratório de Micobactérias.

Para complementar o diagnóstico o Serviço possui ainda um Laboratório de Biologia Molecular, um Laboratório de Micologia e um Laboratório de Serologia.

Durante o estágio teve oportunidade de passar pelos diversos Setores do Serviço e acompanhar e executar a maioria das suas metodologias. Não obstante a passagem pelas restantes áreas, teve uma permanência maioritária nos primeiros dois Laboratórios (abaixo descritos), para aperfeiçoamento das técnicas de sementeira, leituras e execução das provas para identificação dos diferentes microrganismos, bem como a respetiva interpretação dos resultados. O Laboratório de Micologia não é abordado, uma vez que o tempo que lhe foi dedicado foi muito escasso, devido ao baixo número de amostras rececionado.

7.1. Setor de receção, processamento e sementeira das amostras

Este Setor assegura a receção dos produtos, a realização das sementeiras adequadas, as colorações de Gram e *Ziehl-Neelsen*, a monitorização das Hemoculturas, os exames parasitológicos de fezes e, ainda, a realização de alguns testes rápidos de deteção antigénica.

Para um correto exame cultural, essencial ao diagnóstico microbiológico, é necessário que cada amostra seja semeada em determinados meios de cultura,

adequados ao crescimento dos microrganismos mais frequentemente isolados do tipo de produto em causa. Os meios de cultura mais utilizados pelo Serviço de Microbiologia são o Ágar de Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED), a Gelose Sangue (GS), a Gelose Chocolate (GC), o Ágar *MacConkey* (MAC), o Ágar *Sabouraud*, o Ágar *Salmonella Shigella* (SS), o Meio Cromogénico de *Salmonella* (SM2), os caldos de Gram-negativas (GN) e *Todd-Hewitt* e o Ágar Cromogénico de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA). Na Tabela 13 é apresentado o esquema dos meios de cultura utilizados nas sementeiras de cada produto, bem como os casos em que são realizados esfregaços sanguíneos para coloração e observação microscópica.

Tabela 13 - Meios de cultura selecionados para semear as diferentes amostras biológicas e lâminas para Coloração de Gram e *Ziehl-Neelsen*.

Tipo de produto	Meios de cultura	Lâminas
Urina	CLED	Não aplicável
Urinas de nefrostomias	CLED e GS	Não aplicável
Fezes	MAC, MSA, <i>Sabouraud</i> , SS, SM2, Caldo GN	Não aplicável
LAB	GS, GC, MAC, MSA, <i>Sabouraud</i>	Gram e <i>Ziehl-Neelsen</i>
LBA	GS, GC, MAC, MSA, <i>Sabouraud</i>	Gram e <i>Ziehl-Neelsen</i>
Fragmento de tecido	GS, GC, MAC, MSA, <i>Sabouraud</i>	Gram e <i>Ziehl-Neelsen</i>
Líquidos e Exsudados	GS, GC, MAC, MSA, <i>Sabouraud</i>	Gram e <i>Ziehl-Neelsen</i>
Exsudado da orofaringe	GS, GC, MSA, <i>Sabouraud</i> , Caldo <i>Todd-Hewitt</i>	Gram e <i>Ziehl-Neelsen</i>
LCR	GS, GC, <i>Sabouraud</i>	Gram e <i>Ziehl-Neelsen</i>
Ponta de cateter	GS	Não aplicável
Sangue (Hemoculturas positivas)	GS, MAC	Gram
Zaragatoa nasal	Meio cromogénico MRSA	Não aplicável

Se na requisição constar a pesquisa de microrganismos anaeróbios, o produto é semeado em duplicado em Gelose *Schaedler* e em Gelose *Schaedler* com Vancomicina e Neomicina, os quais incubam em aerobiose e anaerobiose.

Existem ainda meios de cultura específicos para a pesquisa de *Campylobacter* spp. e *Yersinia* spp..

Os exsudados nasais, colhidos em todos os doentes à entrada e saída do internamento e em situações pré-cirúrgicas, são semeados em meios específicos para o despiste de colonização pelo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que são uma causa problemática de infeções nosocomiais.

As amostras de urina são semeadas em meio de CLED com ansa de 1 µL, através de uma estria central, seguida de espalhamento em toda a longitude da placa. Esta técnica permite a avaliação quantitativa das colónias (< ou > a 10⁷ Unidades Formadoras de Colónia (UFC)). A placa incuba em estufa a 37°C por 24 horas.

As pontas de cateter são semeadas por rolamento em gelose sangue. As restantes amostras são semeadas por técnica de esgotamento total em quadrantes.

Para a realização das sementeiras o laboratório possui uma câmara de fluxo laminar.

7.1.1. Coloração de Gram e *Ziehl-Neelsen*

Os esfregaços para Coloração de Gram e *Ziehl-Neelsen* e posterior observação microscópica são executados em exsudados, líquidos, expetorações, SB e LCR.

A Coloração de Gram baseia-se na capacidade de determinadas bactérias reterem o Complexo Violeta de Cristal-Lugol e, por isso, corarem de roxo, sendo denominadas gram-positivas. Isto deve-se à presença de uma camada de peptidoglicano na sua parede celular. Em contrapartida, outro grupo de bactérias, que não possui essa característica, é corado pela Fucsina, surgindo a rosa – Gram-negativas.

A Coloração de *Ziehl-Neelsen* baseia-se na resistência das micobactérias, como *Micobacterium tuberculosis*, à descoloração por Soluções Ácido-alcoólicas, que se deve à presença de ácidos micólicos na parede celular. As restantes bactérias sofrem descoloração, sendo coradas pelo Azul de Metileno. Assim sendo, as micobactérias surgem a rosa e as restantes a azul.

Ambas as colorações são realizadas no equipamento *MIRASTAINER®* (Merck).

7.1.2. Incubação

A incubação é o passo que se segue à realização das sementeiras. Os meios de GS e de GC incubam numa estufa com atmosfera a 37°C de 5% CO₂ e os restantes incubam em estufa a 37°C. As placas correspondentes a urinas (meios CLED) apenas incubam vinte e quatro horas, os meios de *Sabouraud* incubam durante cinco dias e os restantes meios incubam por quarenta e oito horas.

No caso de meios de cultura para pesquisa de anaeróbios, a incubação é feita em aerobiose e anaerobiose, em paralelo.

7.1.3. Detecção de antígenos por Ensaio Imunocromatográfico

A deteção antigénica por Imunocromatografia permite um diagnóstico rápido e simples de executar. Para isso são utilizados anticorpos monoclonais específicos dos antígenos e anticorpos policlonais, adsorvidos a uma membrana de nitrocelulose. Este tipo de método é utilizado para as seguintes determinações:

- Detecção de antígeno de *Clostridium difficile*, através do kit *K-Set (Corisbio)*, em amostras de fezes diarreicas;
- Detecção de antígeno de *Legionella pneumophila*, através do kit *BinaxNOW Legionella Urinary Antigen Card (Alere™)*, em amostras de urina;
- Detecção de antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, através do kit *BinaxNOW® (Alere™)*, em amostras de urina e soro.

Neste tipo de testes, um resultado positivo caracteriza-se pela presença de duas bandas, uma de controlo e uma de teste.

7.1.4. Exame parasitológico de fezes

O exame parasitológico de fezes tem por base o Método de Sedimentação por Centrifugação de *Ritchie*, para concentração de ovos e cistos de parasitas e posterior identificação. O kit utilizado é o *IBERKIT Easy-Copros*, que envolve a utilização de agentes químicos (Formalina e Triton-X), para dissolução e digestão das fezes, e um sistema de filtração, para separação dos parasitas. A suspensão resultante é observada ao Microscópio Ótico para pesquisa de parasitas e sua identificação.

7.1.5. Hemoculturas

As Hemoculturas são analisadas no sistema automático de deteção de crescimento microbiano *BD BACTEC™*. Dos módulos disponíveis no Serviço, o 9000MB é o mais utilizado. Estes equipamentos têm por base uma Tecnologia de Fluorescência que permite monitorizar continuamente o crescimento de microrganismos através do aumento da concentração de CO₂, durante um período de incubação e agitação de cinco dias. Para isto estão equipados com um sensor sensível a este gás e um fotodetector. As amostras são testadas a cada dez minutos e, em caso de uma amostra positiva, o aparelho emite um sinal e a Hemocultura é recolhida, bem como o gráfico que regista a fluorescência ao longo do tempo. De seguida, procede-se a sementeiras em GS e MAC e faz-se um esfregaço numa lâmina para Coloração de Gram. No caso de Hemoculturas em anaerobiose positivas as sementeiras são feitas em duplicado, de modo a incubar em aerobiose e anaerobiose.

7.2. Setor de Leituras, Provas acessórias, Identificação e Testes de suscetibilidade

7.2.1. Observação microscópica de lâminas

As lâminas são observadas ao Microscópio Ótico assim que a coloração seja executada. Durante a observação microscópica (Figura 11) é necessário semiquantificar, por campo de ampliação de 1000x, as células epiteliais e os leucócitos em <10, entre 10-25 e >25. As amostras com mais do que dez células epiteliais por campo, devem ser interpretadas de modo adequado, dado tratar-se de uma amostra de baixa qualidade. A flora microbiana presente é avaliada qualitativamente, classificada como gram-positivo ou -negativo, cocos ou bacilos, tipo de agrupamento, e outras informações pertinentes. A presença de fungos é também mencionada.

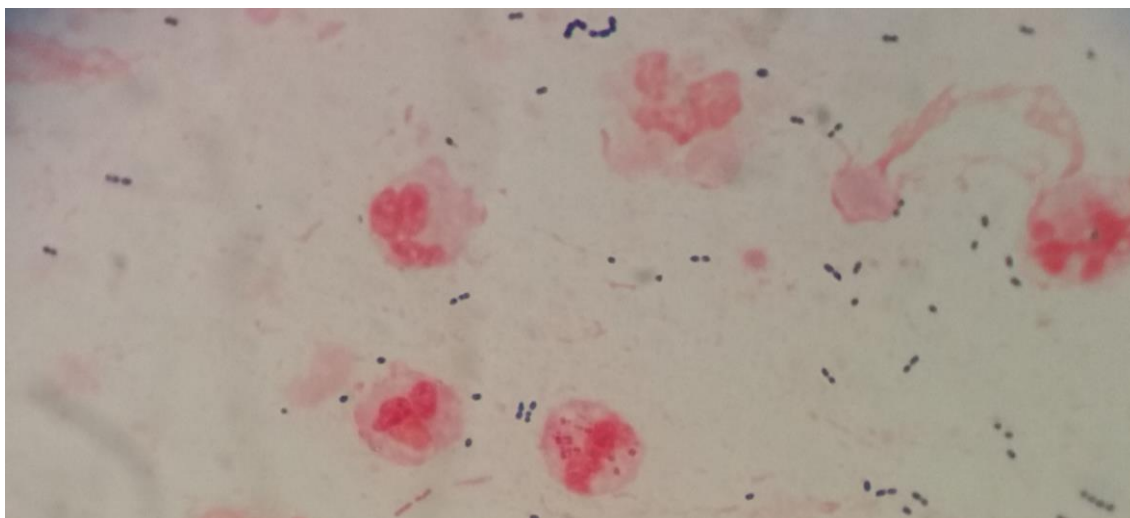


Figura 11 – Coloração de gram, observada por Microscopia Ótica, sob ampliação de 1000x: Células<10, Leucócitos<10, presença de cocos gram-positivos e bacilos gram-negativos.

7.2.2. Leituras

O tipo de valorização do crescimento microbiano a considerar é dependente da situação clínica do doente e do tipo de produto semeado. É fundamental conhecer a flora saprófita de cada tipo de amostra biológica bem como os principais agentes causadores de infeções (Figura 12 e Figura 14). Para além disso, é necessário distinguir culturas puras de culturas mistas (Figura 13).

É avaliado o crescimento microbiano, nomeadamente a morfologia das colónias (mucoides, secas, pequenas, grandes, translúcidas, opacas), a sua cor e cheiro, o crescimento nos diferentes meios, o tipo de Hemólise em GS e a fermentação de determinados componentes presentes nos meios, como o Manitol e a Lactose. Caso o crescimento ainda não seja suficiente as placas reincubam até ao dia seguinte.

Nesta fase são tomadas decisões relativamente à continuação do estudo, nomeadamente os isolamentos, provas acessórias e antibiogramas a realizar e quais as cartas de identificação a utilizar.

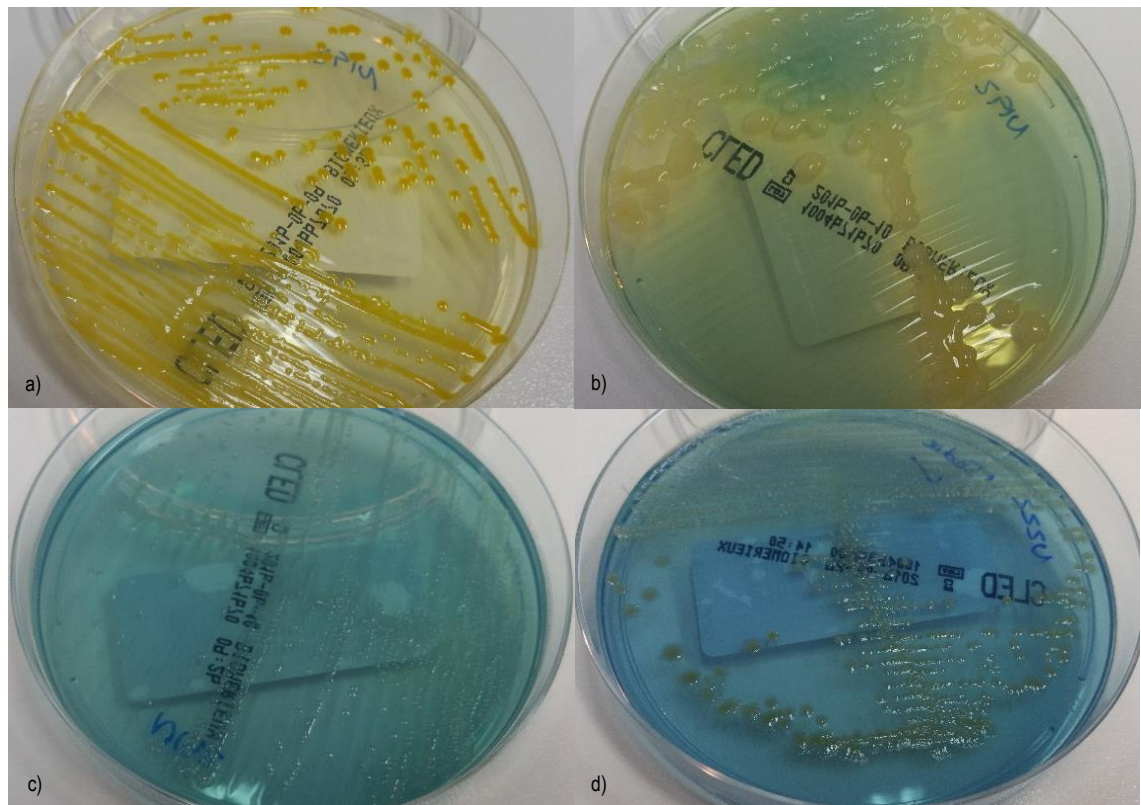


Figura 12 – Agentes frequentemente isolados em urina, após sementeira em CLED e incubação: a) Isolamento de *E. coli*, fermentador da lactose; b) Cultura pura de *K. pneumoniae*, fermentador da lactose; c) Cultura pura de *Proteus* spp. com colónias isoladas, devido à utilização do meio de CLED que evita o fenómeno de *swarming*, não fermentador da lactose; d) Cultura pura de *P. aeruginosa*, com colónias produtoras de pigmento esverdeado, não fermentador da lactose.

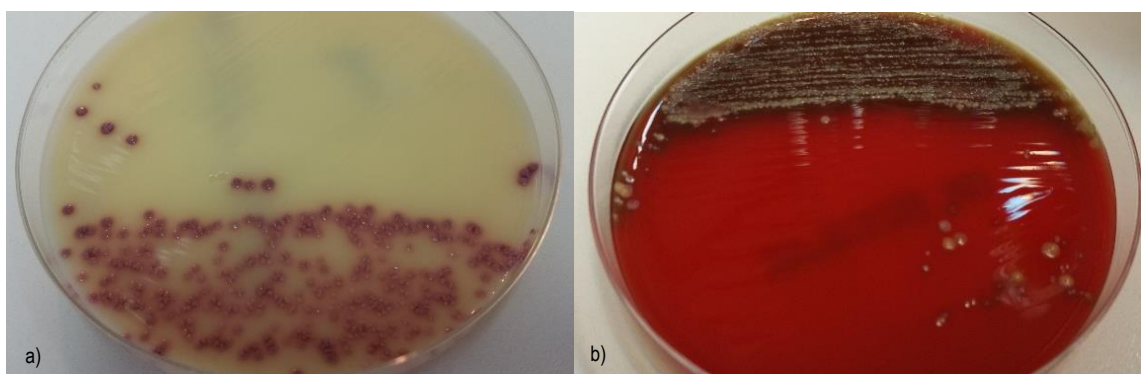


Figura 13 – À esquerda (a)), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, isolado em Meio Cromogénico de MRSA a partir de uma zaragatoa nasal; à direita (b)), flora mista, não valorizável na interpretação do crescimento microbiano, de uma expetoração semeada em GS.

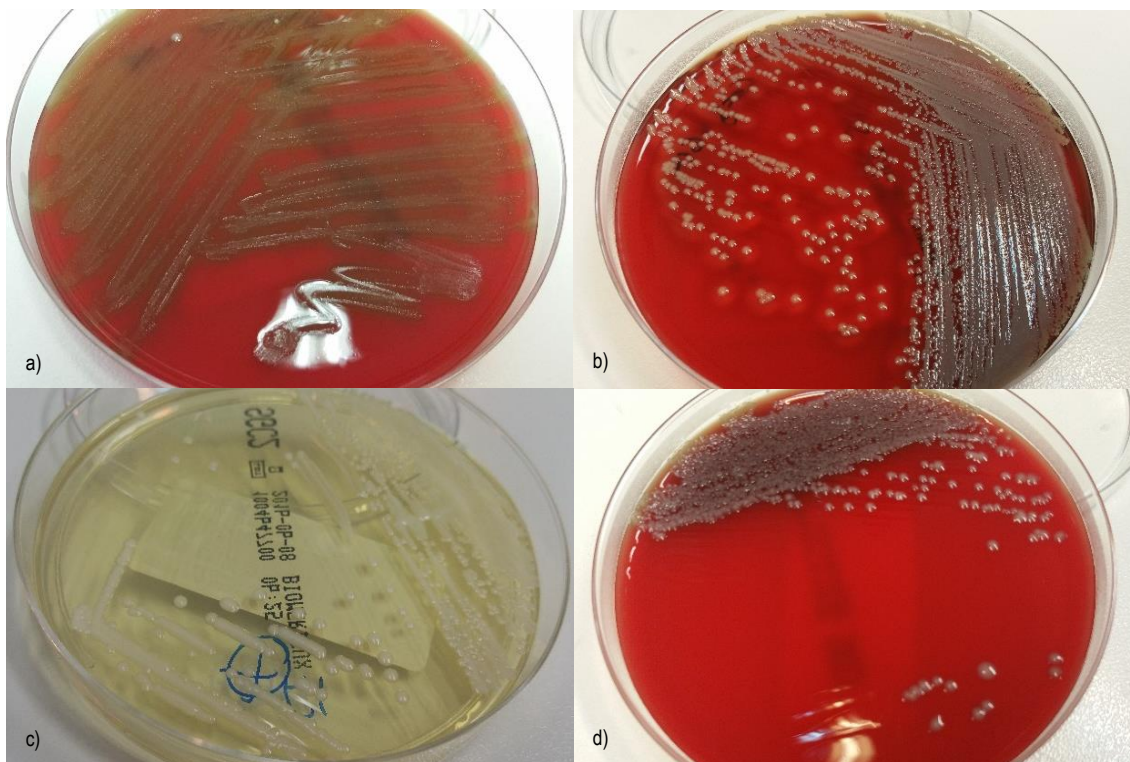


Figura 14 – Alguns agentes patogênicos isolados de secreções respiratórias: a) Cultura pura de *S. pneumoniae* em GS com α -hemólise e colônias com ligeira depressão central; b) Cultura pura de *S. aureus* em GS com β -hemólise e colônias amareladas; c) Isolamento de *C. albicans* em meio de Sabouraud; d) Cultura pura de um bacilo gram-negativo em GS.

7.2.3. Detecção e identificação de *Legionella pneumophila*

Esta determinação assume um papel importante na confirmação do diagnóstico de infecção por *L. pneumophila*. O teste *MONOFLUO*TM anti-*L. pneumophila* (Bio-Rad), baseia-se na Imunofluorescência Direta. É utilizado um reagente de coloração, que contém um anticorpo monoclonal específico de *L. pneumophila* marcado com Isotiocianato de Fluoresceína e um contra-corante. São preparados esfregaços da amostra em duplicado, em lâminas de 2 poços. Na observação ao Microscópio de Fluorescência, um resultado positivo caracteriza-se pelo aparecimento de bacilos ou cocobacilos de fluorescência verde-maçã.

7.2.4. Detecção de *P. jirovecii*

O teste *MONOFLUO*TM *P. jirovecii* (Bio-Rad) é utilizado como auxiliar no diagnóstico de infecção por *P. jirovecii* e baseia-se na Imunofluorescência Indireta. Após lavagem, centrifugação e tratamento enzimático das amostras sob suspeita, são preparados esfregaços em lâminas. Neste teste são utilizados um anticorpo monoclonal de rato anti-*P. jirovecii*, um anticorpo policlonal marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (conjugado) e

um contrastante vermelho. Na observação ao Microscópio de Fluorescência, um resultado positivo caracteriza-se pela presença de oócitos com fluorescência verde de intensidade variável.

7.2.5. Provas auxiliares de diagnóstico

As provas auxiliares têm como finalidade orientar o diagnóstico, na medida em que permitem categorizar o(s) agente(s) isolados dos produtos biológicos. Algumas delas, dada a sua elevada especificidade e fiabilidade, fazem de imediato o diagnóstico, como é o caso da Prova de Identificação de *C. albicans* ou da Prova da Coagulase de *S. aureus*.

7.2.5.1. Prova da Oxidase

A Prova da Oxidase permite categorizar os microrganismos como utilizadores ou não da glicose pela via oxidativa através da avaliação da atividade da enzima Citocromo Oxidase, distinguindo as *Enterobacteriaceae* não fermentadoras da lactose da *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias oxidase negativas. No Serviço de Microbiologia é utilizado para o efeito o kit *BD BBL™ DrySlide™*.

7.2.5.2. Prova da Catalase

A Prova da Catalase permite categorizar os microrganismos como produtores ou não produtores da enzima Catalase, responsável pelo desdobramento do Peróxido de Hidrogénio em Água e Oxigénio. Um resultado positivo caracteriza-se pela formação de bolhas. Na prática, permite a distinção de microrganismos do género *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

7.2.5.3. Identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus* – *Pastorex™ Staph Plus*

O *Pastorex™ Staph Plus* (Bio-Rad) é um teste rápido de identificação de *S. aureus*, que se baseia numa reação de aglutinação com partículas de latex sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos de antígenos da parede celular e da cápsula de *S. aureus*. Um resultado positivo caracteriza-se por um aglutinado vermelho sob um fundo branco.

Este teste é apenas presuntivo, o que requer confirmação dos resultados positivos através da realização da Prova da Coagulase.

7.2.5.4. Prova da Coagulase

A Prova da Coagulase permite fazer o diagnóstico do *S. aureus*, que produz a enzima Coagulase, distinguindo-o de outros *Staphylococcus* coagulase negativos. Este teste consiste na suspensão de duas a três colónias em plasma humano colhido com Citrato de

Sódio e na avaliação da formação de um coágulo até às quatro horas de incubação (Figura 15).

Em placas de Meio Cromogénico de MRSA com crescimento de *S. aureus* é realizada a Prova da Coagulase para confirmação do diagnóstico.

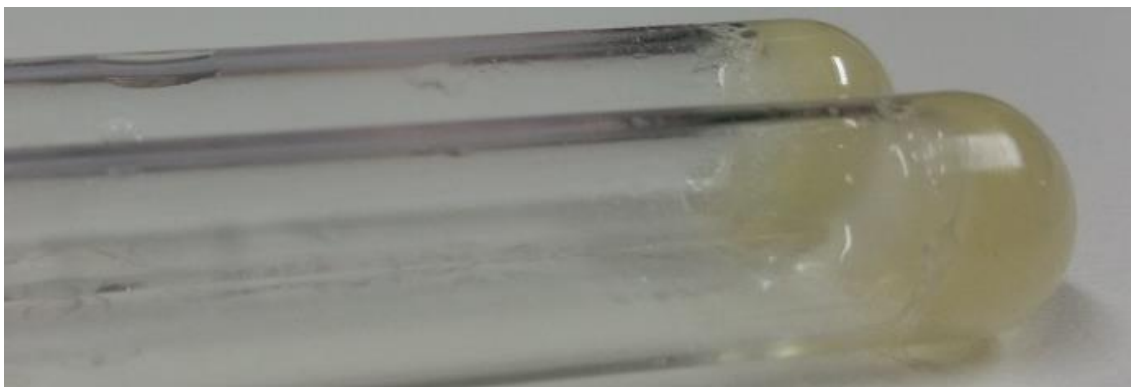


Figura 15 – Prova da Coagulase positiva.

7.2.5.5. Prova de Sensibilidade à Optoquina

A Prova de Sensibilidade à Optoquina é um teste que permite a identificação presuntiva de *Streptococcus pneumoniae*, tendo por base a inibição do seu crescimento em torno do disco de Optoquina (Figura 16). Para isso, as colónias suspeitas são semeadas diretamente em GS, é colocado um disco do antibiótico e incuba por 24h, a 37°C, em estufa de 5% CO₂, para posterior leitura do halo de inibição.



Figura 16 – Prova de Sensibilidade à Optoquina em GS para diagnóstico de *S. pneumoniae*.

7.2.5.6. Prova do Satelitismo

A Prova do Satelitismo permite a identificação de *Haemophilus* spp., tendo por base o seu crescimento na presença dos fatores NAD (V) e Hemina (X). É preparada uma

suspensão a 0,5 mcF em Gelose *Mueller-Hinton*, que incuba por 24h a 37°C, em estufa de 5% CO₂, na presença dos seguintes discos: X, V e XV. A espécie *H. influenzae* só apresenta crescimento na presença de ambos os fatores, ou seja, em torno do disco XV.

7.2.5.7. Identificação de *C. albicans*

A identificação imunológica de *C. albicans*/*C. dubliniensis* pode ser feita recorrendo ao kit *Bichro-Latex Albicans Fumouze®*, a partir de colónias isoladas, por aglutinação de partículas de latex sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos deste grupo. Um resultado positivo caracteriza-se pela presença de um aglutinado rosa sob fundo verde, após cinco minutos de agitação (Figura 17).

Durante o estágio teve oportunidade, não só de executar este teste, como realizar a tradicional Prova da Filamentação, que se baseia na capacidade da *C. albicans* produzir tubos germinativos até às duas horas de incubação em plasma (Figura 18).



Figura 17 – Teste utilizado para a identificação imunológica de *C. albicans*/*C. dubliniensis*. Na carta a primeira fila é negativa e a segunda é positiva (aglutinação rosa sob fundo verde).

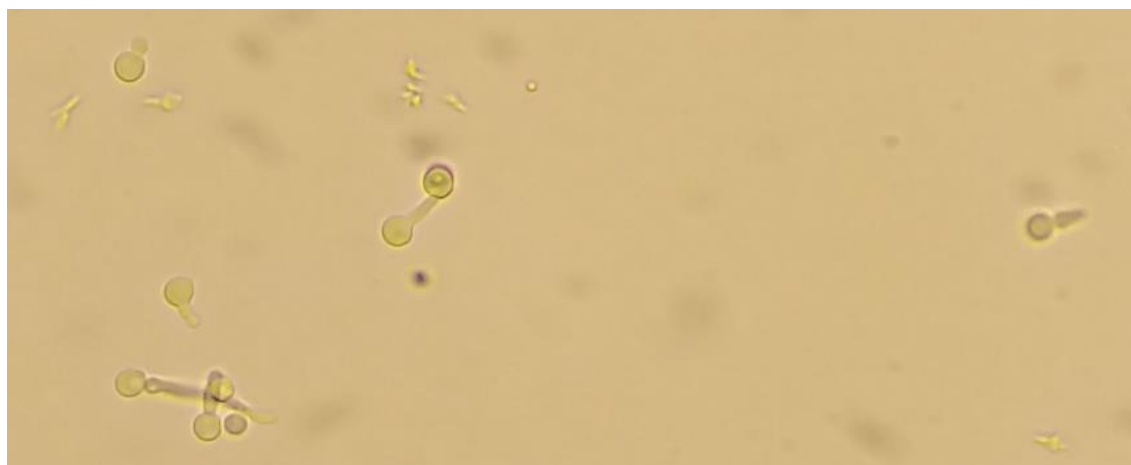


Figura 18 – Prova da Filamentação positiva, produção de tubo germinativo de *C. albicans*.

7.2.5.8. Serogrupagem de *Lancefield*

A Serogrupagem de *Lancefield* baseia-se na presença de antígenos específicos de determinados grupos de bactérias, como é o caso do *S. pyogenes* (grupo A), *S. agalactiae* (grupo B), ou do *E. faecalis* (grupo D). Para a realização deste teste utiliza-se o kit *SLIDEX® Strepto Plus* (Biomérieux), que consiste na preparação de uma suspensão da colónia numa solução de enzima de extração e posterior avaliação da reação de aglutinação com vários reagentes, contendo anticorpos específicos para os antígenos de cada um dos grupos. Um resultado positivo é indicado pelo aparecimento de aglutinação nítida em dois minutos (Figura 19).

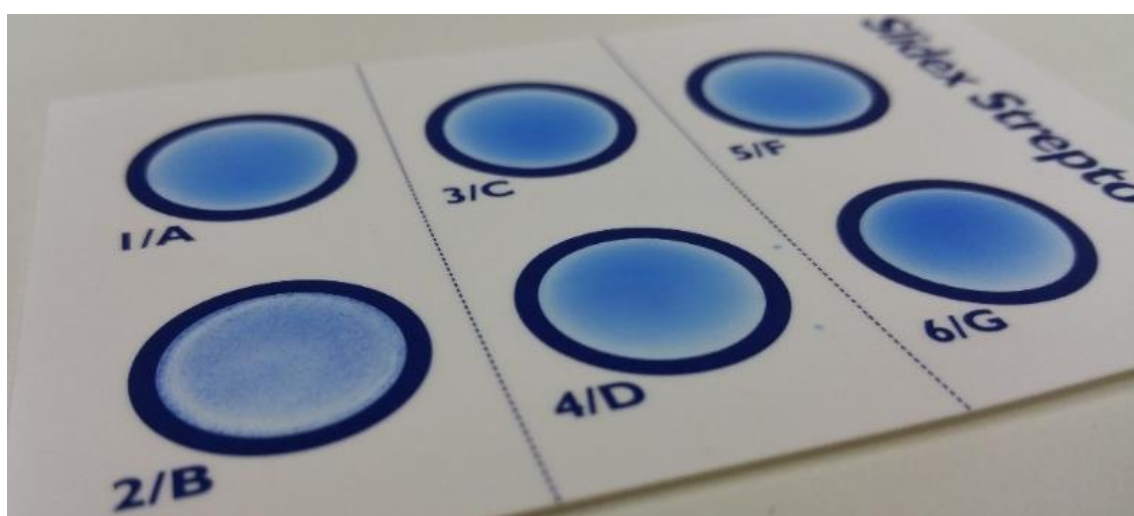


Figura 19 – Serogrupagem de Lancefield com o kit *SLIDEX® Strepto Plus* (Biomérieux). Na carta observa-se aglutinação com os anticorpos específicos do Grupo B, indicativo de *S. agalactiae*.

7.2.6. Identificações e Testes de Suscetibilidade

A identificação e antibiogramas dos microrganismos isolados podem ser efetuados recorrendo a técnicas manuais, ou através dos sistemas de identificação automáticos – o *Vitek 2™* (Biomérieux) e o *MicroScan Walk Away* (Beckman Coulter). Durante o estágio teve oportunidade de trabalhar com ambos os equipamentos, bem como executar as técnicas manuais.

O Serviço de Microbiologia segue as recomendações da norma de 13/10/2015 da Direção Geral de Saúde para reportar os microrganismos alerta e problema e os critérios do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para interpretação de antibiogramas.

7.2.6.1. Preparação da suspensão microbiana

O primeiro passo para a realização das identificações e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos é a preparação de suspensões microbianas. O tipo de suspensão preparada é diferente entre os equipamentos e para as técnicas manuais.

O *Vitek 2TM* (Biomerieux) utiliza uma suspensão microbiana preparada com uma determinada turvação, na escala de Mcfarland, por inoculação das colónias sob estudo em solução salina estéril, conforme a Tabela 14, e cartas de identificação e de determinação da suscetibilidade.

Tabela 14 - Suspensões a utilizar no *Vitek 2TM*.

Grupo de microrganismo	Suspensão (mcF)
Gram-positivo e Gram-negativo	0,55-0,65
Leveduras	1,80-2,20
Anaeróbios, <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophylus</i> spp.	2,70-3,30

No *MicroScan WalkAway* são utilizadas microplacas e o sistema *Prompt*, que assegura um inóculo padronizado, sem necessidade de avaliar a sua turvação.

Para antibiogramas manuais com tiras de *E-test* e com discos impregnados de antibiótico, são preparadas suspensões a 0,5 *Mcfarland*, que são semeadas em meios de *Mueler-Hinton* por Técnica de Esgotamento. Para avaliação da suscetibilidade de *Enterococcus* spp. à Vancomicina utiliza-se uma suspensão a 2,0 *Mcfarland*.

7.2.6.2. Identificações automáticas

Ambos os equipamentos se baseiam em leituras espectralométricas e turbidimétricas, resultantes de reações químicas decorrentes em painéis contendo substratos bioquímicos hidrolisados e suspensão microbiana adicionada. As reações decorrentes entre os diferentes substratos e o microrganismo presente vão permitir caracterizar o seu perfil metabólico. Por comparação com uma base de dados, é possível obter a sua identificação.

7.2.6.3. Testes de suscetibilidade automáticos

Relativamente aos antibiogramas, ambos os equipamentos se baseiam na determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de cada antibiótico, de um painel predefinido para determinado grupo de bactérias. Assim, para esse painel, o microrganismo é classificado como sensível, resistente ou de sensibilidade intermédia.

7.2.7. Estudo das resistências a antibióticos

As resistências são uma problemática eminente, derivada da prescrição empírica e intensiva de antibióticos. Por um lado, é importante que todas as bactérias isoladas sejam submetidas a antibiograma, pois a terapêutica deve consistir no antibiótico de mais baixo espectro que seja eficaz sobre o microrganismo em causa, de modo a não selecionar novos mecanismos de resistência. Por outro lado, as resistências devem ser estudadas, de modo a melhorar a sua compreensão, para que novos agentes com novos alvos possam emergir.

Ambos os equipamentos utilizados pelo Laboratório possuem a capacidade de detetar a produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBL), um mecanismo bastante preocupante que é responsável pela resistência aos β -lactâmicos. Por outro lado, atendendo ao perfil de suscetibilidade de cada bactéria, os equipamentos são capazes de sugerir possíveis mecanismos, para posterior investigação e ainda emitir alertas quando são detetados microrganismos alerta.

Quando são detetadas resistências aos Carbapenemos é necessário avaliar a produção de Carbapenemases pelos microrganismos em questão, uma vez que os genes responsáveis por esta característica podem ser transferidos horizontalmente a outras bactérias, alastrando-se. Por esta razão, os doentes são colocados em isolamento. O Laboratório utiliza o teste *RAPIDEC® Carba NP (Biomerieux)* para a deteção direta da produção de Carbapenemases (sem distinção do tipo) que, ao hidrolisarem os Carbapenemos, acidificam o meio, levando a uma alteração colorimétrica.

Durante o estágio, teve oportunidade de analisar os resultados dos antibiogramas fornecidos pelos equipamentos e compreender o papel do analista clínico, no sentido de duvidar de alguns resultados, ou, de requerer confirmação de outros. Neste contexto, é de extrema importância, não só conhecer as resistências intrínsecas, como as resistências adquiridas iminentes e que devem ser reportadas à Direção Geral de Saúde.

7.3. Laboratório de Micobactérias

O Laboratório de Micobactérias é responsável pela investigação laboratorial de amostras suspeitas de infeção por micobactérias, como o Bacilo de *Koch*.

A Tuberculose caracteriza-se por uma primoinfeção, uma fase latente (que pode durar toda a vida) e uma reativação/tuberculose secundária. Esta última, não sendo comum em indivíduos imunocompetentes, é mais frequente em indivíduos imunocomprometidos, e pode ser pulmonar ou extrapulmonar. Deste modo, este é um estudo bastante pedido nos doentes do IPO-Porto, em amostras que podem ser provenientes do trato respiratório, ou de outro local, como lavados gástricos, LCR, entre outros.

O exame micobacteriológico envolve várias etapas: descontaminação das amostras, realização do exame cultural em Meio de *Löwenstein-Jensen* (LJ) e *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT™), observação microscópica de lâminas coradas pela Auramina e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. A identificação ao nível da espécie é realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular.

7.3.1. Descontaminação

A descontaminação é uma etapa fundamental para garantir que se consegue cultivar as micobactérias. Consiste na liquefação, descontaminação e concentração das amostras. A descontaminação tem como objetivo inibir a proliferação de outras bactérias e fungos que, dado a sua maior rapidez de crescimento, acabariam por impossibilitar o isolamento e crescimento das micobactérias. O reagente de digestão *MycoPrep*, que contém N-Acetil-L-Cisteína, Hidróxido de Sódio (NaOH) 2% e suplemento antibiótico, potencia este processo, bem como a liquefação. A concentração é conseguida por centrifugação (3500rpm, 15min).

7.3.2. Exame cultural

O passo que se segue é o exame cultural da amostra descontaminada, em Meios de LJ e MGIT e a execução de lâminas para posterior coloração de Auramina e observação microscópica. Nesta fase é necessário acertar o pH a 6,8, através da utilização de tiras indicadoras, Tampão Fosfato e Ácido Clorídrico (HCl).

Os Meios de LJ cultivados incubam na estufa a 37°C com 5% CO₂, primeiramente na horizontal, de modo a distribuir e secar a amostra sobre o meio, e, posteriormente, na vertical, onde permanecem até oito semanas. O aparecimento de colónias de morfologia característica caracteriza um resultado positivo (Figura 20).

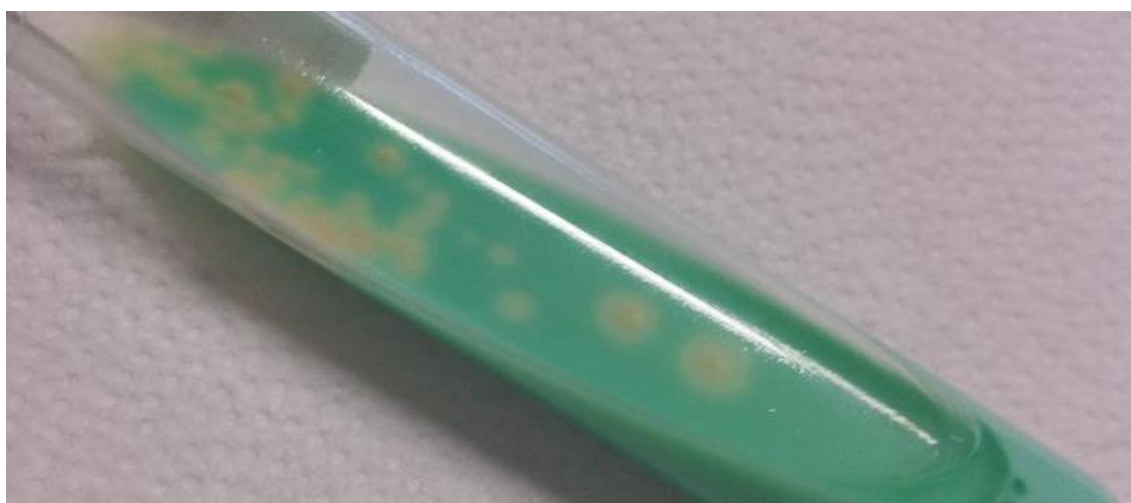


Figura 20 – Meio de LJ, com crescimento de micobactérias.

Os Meios MGIT (Figura 21) são colocados no sistema de detecção *BACTEC™ MGIT™ 960*, que se baseia na detecção de uma alteração na Fluorescência, derivada da diminuição do Oxigénio disponível associado ao crescimento bacteriano. Nestas situações, o aparelho emite um sinal e identifica a amostra positiva; são efetuadas lâminas para Coloração de Gram e Ziehl-Neelsen e a observação microscópica do esfregaço permite confirmar se a amostra possui micobactérias, uma vez que os falsos positivos ainda são frequentes.

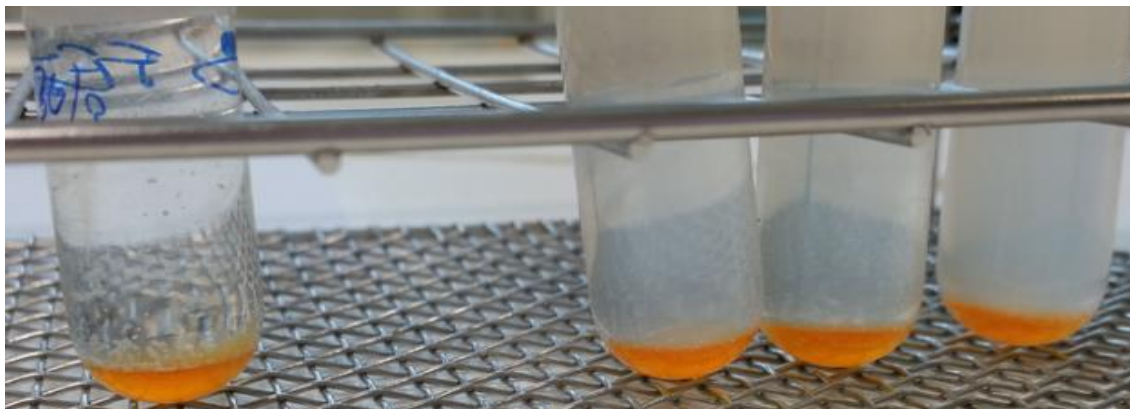


Figura 21 – Meio de MGIT; à esquerda o tubo sem crescimento e à direita tubos com crescimento microbiano (turvação do meio).

7.3.3. Coloração de Auramina

As lâminas coradas pela Auramina são observadas por Microscopia de Fluorescência. Apesar de apresentar baixa sensibilidade, este é um teste que permite uma detecção rápida (<48h). A Coloração pela Auramina baseia-se na resistência das micobactérias à descoloração por Soluções Ácido-alcoólicas, permanecendo coradas pela Auramina, um corante básico, enquanto os restantes microrganismos são corados pelo corante secundário (Azul de Metileno). Uma amostra é considerada positiva quando se observam bacilos de fluorescência verde (Figura 22).

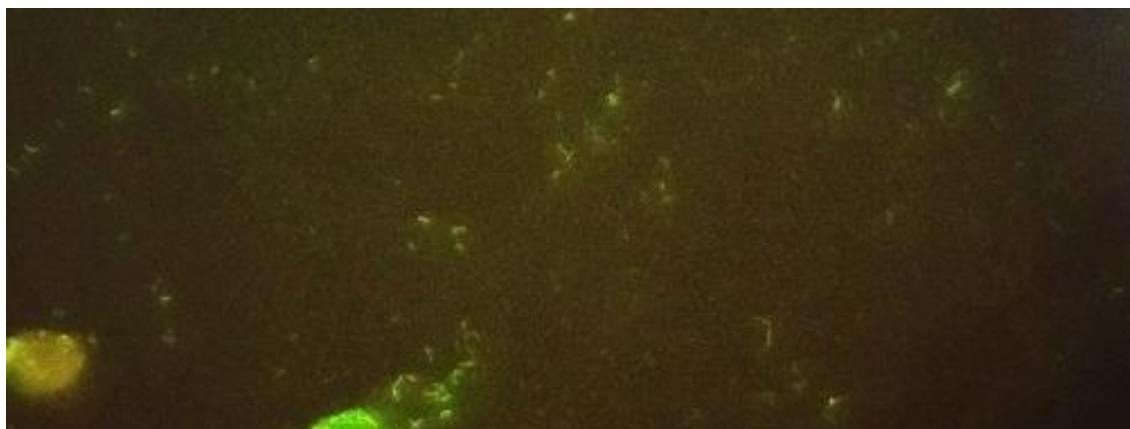


Figura 22 – Bacilos de fluorescência verde em lâmina corada pela Auramina, sob Microscopia de Fluorescência (ampliação de 400x).

7.3.4. Antibiograma

A última etapa do diagnóstico passa pela avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos disponíveis nas amostras de culturas que se revelaram positivas, nomeadamente: Streptomina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida.

Para isso, a amostra positiva é transferida para novos tubos de MGIT, cada um com um determinado antibiótico. Os tubos são colocados no *BACTEC™ MGIT™ 960*, para avaliação do crescimento. A bactéria é considerada resistente ao antibiótico se apresentar crescimento durante o período de incubação.

É utilizada uma amostra positiva como controlo.

7.4. Laboratório de Serologia

Neste laboratório são realizados os serodiagnósticos de Salmonelose, Brucelose, Riquettsiose, Toxoplasmose e Sífilis.

7.4.1. Serodiagnóstico de antígenos febris

A pesquisa de determinados anticorpos em amostras de soro assume um papel fundamental no auxílio do diagnóstico de doenças infecciosas caracterizadas por febre persistente, como a Salmonelose, a Brucelose e doenças causadas por *Rickettsia* spp.

Para isso, são utilizados testes que se baseiam em reações de aglutinação, visíveis a olho nu, entre anticorpos presentes no soro de doentes e os respetivos antígenos febris. São testes semiquantitativos, na medida em que as amostras são pré-diluídas e o título de anticorpos é inferido pela menor diluição com aglutinação visível.

Reação de *Widal* para pesquisa de anticorpos anti-O e anti-H de *Salmonella enterica*, serotipo *Typhi* e de anti-A e anti-B de *Salmonella enterica*, serotipo *Paratyphi*.

Reação de *Weil-Felix* para pesquisa de anticorpos de *Rickettsia* através da utilização de antígenos de *Proteus* spp (OX19, OXK e OX2).

Prova Rosa de Bengala (RB) para pesquisa de anticorpos de *Brucella* spp. através da utilização de *B. abortus* inativado, corado de Rosa Bengala e acidificado (pH 3,6).

7.4.2. Serodiagnóstico de Toxoplasmose

Recorrendo ao aparelho MiniVidas®, partilhado com o Serviço de Virologia, é realizada a deteção quantitativa de IgG e IgM específicas de *Toxoplasma gondii* no soro por ELFA.

7.4.3. Serodiagnóstico de Sífilis

O diagnóstico da Sífilis é feito maioritariamente por reações serológicas – dado que o seu agente etiológico (*T. pallidum*) não é cultivável em laboratório – através da deteção de anticorpos (reaginas) em amostras de soro, quer por reação *in vitro* com uma suspensão de lípidos (teste não treponémico) quer com antígenos de *T. pallidum* (teste treponémico).

O SYPAL CB (*Diagast*) é o teste não treponémico utilizado e consiste numa reação de floculação em carta, visível a olho nu, ao fim de seis minutos de agitação. Os testes não treponémicos não permitem uma deteção tão precoce e perdem sensibilidade na sífilis tardia.

Os testes treponémicos são mais específicos, sendo mais sensíveis na sífilis primária e permanecendo positivos na sífilis tardia. O TPHA (*Treponema pallidum Hemagglutination*) (*Bio-Rad*) é o teste utilizado, que utiliza eritrócitos sensibilizados com *T. pallidum*, que aglutinam com os anticorpos presentes na amostra do doente (Figura 23). Como controlo negativo são utilizados eritrócitos não sensibilizados.

Os dois testes são interpretados paralelamente, e tendo em conta o histórico do doente, de modo a inferir acerca do estado da infeção e/ou para o seu controlo e para detetar reinfeções. O Laboratório de Serologia tem ainda disponíveis testes de Imunofluorescência.

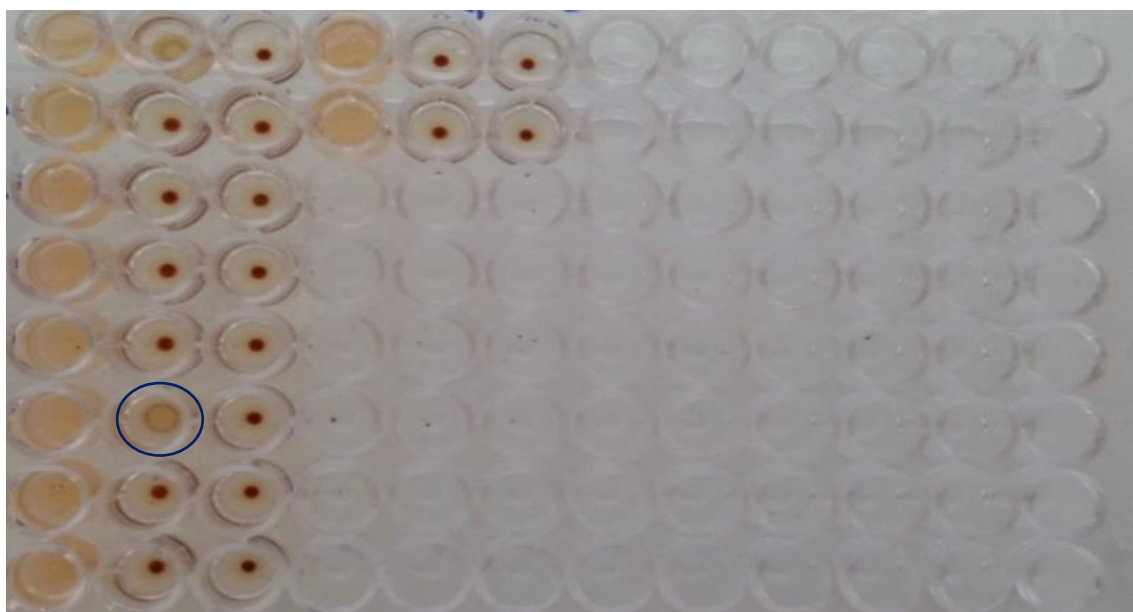


Figura 23 – Teste Treponémico TPHA; por comparação com os poços controlo, verifica-se a presença de sete amostras negativas e uma amostra positiva (assinalada).

7.5. Serviço de Microbiologia – Laboratório de Biologia Molecular

O Laboratório de Biologia Molecular assume um papel fundamental de diagnóstico e identificação de algumas infeções microbianas. A lista dos testes acompanhados durante o período de estágio está representada na Tabela 15.

Tabela 15 - Lista de testes e respetivas técnicas realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Microbiologia.

Teste	Técnica
Pesquisa e identificação de RNA <i>Aspergillus</i> spp.	RT-PCR em Tempo Real
Pesquisa e identificação de RNA de <i>Candida</i> spp.	
Pesquisa e identificação de RNA de Micobactérias	
Pesquisa do antígeno <i>Galactomannan</i> de <i>Aspergillus</i> spp.	ELISA
Pesquisa de Toxina A e B de <i>Clostridium difficile</i>	Imunocromatografia
Pesquisa do <i>locus</i> de patogenicidade de <i>C. difficile</i>	Amplificação de DNA Isotérmica Mediada por <i>Loop</i>

7.5.1. Detecção do antígeno *Galactomannan* por Ensaio Imunoenzimático

Os doentes oncológicos, constantemente submetidos a tratamentos imunossupressores, apresentam um risco acrescido de desenvolver Aspergilose Invasiva. Como auxiliar no diagnóstico de infeção por *Aspergillus* spp. é utilizada a deteção de antígeno *Galactomannan* em amostras de soro e Lavado Broncoalveolar, através do kit *PLATELIA™ ASPERGILLUS Ag*. Consiste num ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich* em microplacas sensibilizadas com anticorpos monoclonais EBA-2 de rato específicos para o antígeno *Galactomannan*.

7.5.2. *Clostridium difficile* – Detecção do *locus* de patogenicidade e das toxinas A e B

A pesquisa de *C. difficile* é efetuada em amostras de fezes de doentes com episódios de diarreia. Para efeitos de *screening* é realizado o teste imunocromatográfico *Clostridium K-Set*.

Sempre que um teste antígeno se revele positivo, o estudo prossegue com a deteção do *locus* de patogenicidade, por uma técnica de amplificação de DNA, através do kit *Illumigene*. Paralelamente, realiza-se a deteção das toxinas A e B através do teste imunocromatográfico *ImmunoCard Toxins A & B*.

No *Illumigene* a amostra é sujeita a um choque térmico e posteriormente pré-tratada com um tampão, sendo depois amplificada e detetada a 63°C no *Illumipro*, por uma técnica

de amplificação de DNA isotérmica mediada por *loop*. O produto amplificado é um fragmento de 240 pb do gene da toxina A. Como controlo positivo da amplificação é utilizado o *S. aureus* e *primers* específicos.

Como resultado da amplificação forma-se pirofosfato de magnésio, que confere turbidez à solução de reação.

7.5.3. Extração de ácidos nucleicos

Para alcançar uma correta extração dos ácidos nucleicos, é necessário que haja uma fase de pré-lise enzimática com tampão de lise e proteinase K, a 65°C durante 30 minutos. No caso da amostra se destinar a pesquisa de fungos é adicionada ainda liticase. No final deste passo segue-se uma incubação a 95°C, durante 15 minutos, para inativar a proteinase K.

A extração de ácidos nucleicos pode ser realizada manualmente, através do kit *QIAmp® DNA Mini kit* (Quiagen®), ou recorrendo ao kit comercial *MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation* e ao equipamento *MagNa Pure Compact*, já abordado no capítulo seis deste relatório. Durante o estágio, apenas houve oportunidade de acompanhar o método automático.

7.5.4. Detecção quantitativa de RNA de micobactérias por RT-PCR em Tempo Real

Em resultados de exame cultural ou Coloração de Auramina positiva, provenientes do Laboratório de Micobactérias, bem como sempre que requisitado pelo médico, é efetuada a amplificação quantitativa do RNA de Micobactérias e sua identificação por Biologia Molecular. A identificação ao nível da espécie é de extrema importância, na medida em que permite selecionar uma terapêutica mais dirigida e adequada.

A técnica utilizada é o RT-PCR em Tempo Real no *LightCycler 1.5*, através da utilização de primers específicos de uma região do gene *myco16S* e de sondas associadas a fluorocromos, que hibridam com os produtos amplificados.

A análise das curvas de *melting* permite a identificação ao nível da espécie.

7.5.5. Detecção quantitativa de RNA de fungos por RT-PCR em Tempo Real

A amplificação e detecção do RNA de fungos do género *Aspergillus* e *Candida* por RT-PCR em Tempo Real é também realizada no *LightCycler® 1.5*, baseando-se no mesmo princípio de hibridação com sondas acopladas a fluorocromos. Neste caso, os primers e sondas utilizados são específicos para uma região do gene 18S rRNA do género e a análise da curva de *melting* permite fazer a identificação ao nível da espécie.

8. Controlo de Qualidade

O objetivo de qualquer Laboratório Clínico é conseguir executar todas as determinações, necessárias ao diagnóstico das várias condições clínicas, com o mínimo erro associado e com o máximo de reprodutibilidade possível. Para isso, torna-se necessário monitorizar a qualidade dos resultados, bem como conhecer as variáveis que a podem colocar em causa.

O Controlo de Qualidade permite essa monitorização, através da avaliação periódica dos procedimentos analíticos, e pode dividir-se em: **Controlo de Qualidade Interno (CQI)** e **Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)**.

O CQI tem como principal objetivo a avaliação da precisão intralaboratorial e toma lugar diariamente em todos os Laboratórios, tanto no início, como durante a rotina laboratorial, ou quando se verifiquem alterações inesperadas nas condições analíticas. No início de cada série de determinações são lidos os controlos e é feita a análise das cartas de *Levey-Jennings* que, tendo em conta as regras de *Westgard*, permite detetar não conformidades. Caso, nesta fase, sejam detetadas não conformidades, são aplicadas medidas corretivas (por exemplo, uma nova calibração, que requer a utilização de soluções padrão, ou seja, de concentrações conhecidas de analitos que permitem traçar uma reta padrão).

As particularidades do CQI e da AEQ são apresentadas de seguida, por Serviço.

8.1. Serviço de Hematologia Laboratorial

Os controlos internos são utilizados diariamente no Autoanalisador Hematológico Sysmex® XN-9000. São utilizados controlos fornecidos pela Sysmex®: três níveis de controlo para sangue periférico – normal, alto e baixo – e dois níveis para líquidos biológicos – *Body Fluid* alto e *Body Fluid* baixo.

O Serviço de Hematologia Laboratorial participa na AEQ do INSA e do UK NEQAS.

O teste de proficiência do INSA envolve três avaliações:

- Contagem celular em sangue total – As amostras são processadas nos três contadores hematológicos em modo manual, para determinação dos seguintes parâmetros: Hemoglobina, Eritrócitos, Hematócrito, VGM, HCM, CHCM, Leucócitos e Plaquetas.
- Contagem de Reticulócitos – As amostras são processadas no módulo Sysmex® XN20 em modo manual, para determinação dos Reticulócitos.
- Contagem diferencial ou estudo morfológico de lâminas de sangue periférico, previamente coradas através da Coloração de *Wright*.

O teste de proficiência do *UK NEQAS* envolve várias avaliações:

- Contagem celular em sangue total (idêntica à referida para o INSA);
- Contagem diferencial automática de leucócitos;
- Contagem de Reticulócitos (idêntica à referida para o INSA);
- Observação de lâminas de sangue periférico (previamente coradas ou fixadas ou para corar através dos métodos utilizados no Serviço) para:
 - contagem diferencial;
 - estudo morfológico;
 - estudo citoquímico;
 - identificação de parasitas.

8.2. Serviço de Imunologia, Laboratório de Citometria de Fluxo

Os controlos internos são utilizados para assegurar a qualidade das leituras efetuadas pelos Citómetros de Fluxo. São utilizadas esferas associadas a fluorocromos dos vários comprimentos de onda. No *BD FACSCanto™ II* o controlo é preparado diariamente, enquanto que nos outros dois citómetros é preparado semanalmente.

O Controlo Externo utilizado pelo Laboratório de Citometria de Fluxo é o “*UK NEQAS for Leucocyte Immunophenotyping*”. Este teste de proficiência processa-se em duas fases de avaliação distintas. Na primeira fase, é avaliada a competência do laboratório para efetuar a caracterização imunofenotípica de uma amostra de leucemia utilizando a citometria de fluxo, por comparação com um grupo consenso. Para isso, é efetuada a marcação dos antígenos que caracterizam a patologia e, após análise, é indicado o imunofenótipo, em termos de positividade e negatividade, e de grau de expressão de cada marcador, bem como as características do ensaio (marca do citómetro, solução de lise utilizada, quantidade de anticorpos, estratégia de *gating*, entre outras.).

Na segunda fase da avaliação, é avaliada a competência do Laboratório em efetuar o diagnóstico da mesma patologia, com base na classificação da Organização Mundial de Saúde, tendo para isso disponível a história clínica, os resultados do grupo de consenso obtidos na primeira fase da avaliação e informação proveniente dos estudos citogenéticos e morfológicos.

8.3. Serviço de Química Clínica

Os controlos internos são utilizados diariamente em todos os equipamentos.

O Laboratório de Bioquímica participa na avaliação externa da qualidade pelo *UK NEQAS* para parâmetros bioquímicos (quinzenalmente) e pelo *UK RIQAS* para doseamento de determinados parâmetros de Endocrinologia.

No Laboratório de Farmacologia é utilizado o *UK NEQAS* por determinação de Catecolaminas Urinárias (mensalmente). Para além disto, é realizada a AEQ do *UK RIQAS* para doseamento de fármacos (quinzenalmente).

8.4. Serviço de Virologia

No aparelho Mini VIDAS® para além do controlo interno inserido mensalmente, que permite a monitorização do sistema ótico e de pipetagem, é utilizado um controlo de qualidade interno independente, que permite uma avaliação em tempo-real da exatidão e precisão da técnica, por construção de uma carta de qualidade e comparação com outras instituições participantes.

Nas lâminas de Imunofluorescência é utilizado um controlo negativo.

Nas PCR são utilizados controlos positivos de amplificação e controlos negativos (água bidestilada).

Nos Imunoensaios de ELFA é utilizado um controlo positivo e nos Imunoensaios de ELISA são utilizados controlos negativos e positivos.

O Serviço de Virologia recebe amostras do *UK NEQAS* para AEQ que inclui as seguintes avaliações:

- Diagnóstico serológico de HAV, CMV e EBV, sendo reportadas as amostras que revelem marcadores de infeção aguda;
- *Screen* do estado imunitário relativamente ao HAV, CMV e VZV.

8.5. Serviço de Microbiologia

O controlo interno dos equipamentos de identificação automáticos é realizado mensalmente, através do processamento de estirpes comerciais, conforme a Tabela 16.

Para a realização das diferentes provas manuais de diagnóstico são também utilizados controlos positivos e negativos, que vêm com os kits.

A qualidade das várias soluções utilizadas é também avaliada com regularidade, sendo semeadas em GS e avaliada a sua esterilidade.

O Serviço de Microbiologia participa na AEQ do *UK NEQAS*.

No Laboratório de Microbiologia, a avaliação envolve a seleção dos meios de cultura adequados, passando pela valorização do crescimento atendendo à história clínica e ao tipo de produto, e pela seleção das provas auxiliares de diagnóstico e das cartas de identificação a utilizar, bem como a respetiva interpretação dos resultados. São ainda enviadas amostras para determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos.

No Laboratório de Biologia Molecular, as amostras são submetidas a deteção de Micobactérias, bem como identificação da espécie e determinação da resistência à rifampicina.

No Laboratório de Micobactérias são recebidas amostras para realizar exame cultural e reportar a presença ou ausência de micobactérias.

Tabela 16 - Estirpes comerciais utilizadas pelos equipamentos de identificação automática para identificação bacteriana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).

Estirpe Comercial	<i>MicroScan WalkAway</i>	<i>Vitek® 2</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> – estirpe 29212	Identificação + CMI	CMI
<i>Staphylococcus aureus</i> – estirpe 29213		CMI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – estirpe 27853		CMI
<i>Escherichia coli</i> – estirpe 25922		CMI
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – estirpe 700603	CMI	CMI

Referências Bibliográficas

1. Bain BJ. Blood Cells: A Practical Guide. 4th ed. Blackwell; 2014. 488 p.
2. Hoffbrand V, Moss P, Pettit J. Acute Leukemias. In: Essential Haematology. 6th ed. 2011. 388 p.
3. Mcpherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Elsevier; 2011. 1543 p.
4. National Institutes of Health. Laboratory water: its importance and application. 2013.
5. Strasinger SK, Schaub Di Lorenzo M. Urinalysis and Body Fluids. F. A. Davis Company Copyright. 2008. 311 p.